H. v. EULER

CHEMIE DER ENZYME

ZWEITER TEIL

ZWEITE UND DRITTE AUFLAGE


SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS

JBC 9:767 Use of Formol Titration in determining pepsin unit.

CHEMIE DER ENZYME

VON

HANS EULER,
PROFESSOR DER CHEMIE AN DER UNIVERSITÄT STOCKHOLM.

ZWEITE, NACH SCHWEDISCHEN VORLESUNGEN VOLLSTÄNDIG UMGEARBEITETE AUFLAGE.

II. TEIL.

SPEZIELLE CHEMIE DER ENZYME.

1. ABSCHNITT:

DIE HYDROLYSIERENDEN ENZYME DER ESTER, KOHLEHYDRATE UND GLUKOSIDE.

MIT 44 TEXTFIGUREN.

MUNCHEN UND WIESBADEN.
VERLAG VON J. F. BERGMANN.
1922.

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz A.G., Würzburg.

Vorwort zum II. Teil.

Bei der Bearbeitung der speziellen Enzymchemie war es meine Absicht, alle Einzeltatsachen und Beziehungen mitzuteilen, welche den mit Enzymen Arbeitenden, dem Forscher auf diesem Sondergebiet, dem Biologen, dem Mediziner und dem in der biochemischen Technik stehenden Praktiker von Nutzen sein können.

Das reichhaltige Material habe ich in zwei Hälften geteilt. Im vorliegenden ersten Abschnitt sind die hydrolysierenden Enzyme der Ester, Kohlehydrate und Glukoside behandelt; im bald folgenden zweiten Abschnitt werden die übrigen Enzyme zusammengefasst.

Der Leser wird finden, dass die Substrate und ihre chemischen Eigenschaften und Umsetzungen ausführlicher erwähnt sind, als dies in früheren Darstellungen dieses Gebietes der Fall war. Es entspricht dies meiner Überzeugung, dass der Ausbau einer möglichst breiten und vertieften konstitutionschemischen Grundlage für die gesunde Entwicklung der Enzymologie von allergrösster Bedeutung ist. Ohne eine solche Grundlage geht viel Arbeit ohne bleibenden Nutzen verloren.

Es liegt in der Natur der Sache, dass die Reaktionskinetik einen wesentlichen Teil unserer Wissenschaft ausmacht; aber die Ergebnisse der theoretischen Chemie können auf die enzymatischen Vorgänge erst dann sachgemäss angewandt werden, wenn die Art der stofflichen Veränderungen und der dabei beteiligten Komponenten erkannt ist. Wo dies der Fall war, ist die auf die Ergebnisse der physikalischen Chemie gestützte exakte Behandlung von Reaktionsgeschwindigkeiten und Gleichgewichten besonders in den letzten Jahren fruchtbar geworden.

Durch die Anwendung dieser quantitativen Methodik auf den lebenden Organismus wird die Enzymchemie zur Entwicklung der Biologie und besonders der Medizin noch wesentlicher beitragen können, als dies bisher geschehen ist. Systematische Bearbeitungen der einzelnen Organe und Lebensprozesse, wie sie mir als Ziel vorschweben, liegen bis jetzt nur vereinzelt vor; ich habe die Darstellung dieses schliesslich wichtigsten Teils der Enzymologie

noch zurückgestellt in der Hoffnung, in den nächsten Jahren mit grösseren Hilfsmitteln einige der jetzt vorhandenen Lücken füllen und dann dieses Buch mit einem dritten Teil: „Über enzymchemische Vorgänge im Organismus“ abschliessen zu können.

Für diesen dritten Teil bilden die beiden vorhergehenden gewissermassen die Voraussetzungen.

In vorliegendem Band, wo Tausende von Einzeltatsachen referiert werden mussten, habe ich mir öfters von Fachgenossen Rat erholen müssen, und so habe ich vielen Kollegen, besonders den Herren Barthel, Freudenberg, O. Hammarsten, Neuberg, Pringsheim, Thunberg und Willstätter bestens zu danken.

An alle Leser richte ich die Bitte, durch Hinweise auf Versehen und Lücken an der Vervollkommnung dieses Buches mitwirken zu wollen.

Schliesslich möchte ich nicht unterlassen, die Unterstützung meiner Assistenten K. Josephson und K. Myrbäck dankbar zu erwähnen.

Stockholm, im August 1922.

Der Verfasser.

Inhalt des 1. Abschnittes.

1. Abschnitt.

Die hydrolysierenden Enzyme
der
Ester, Kohlehydrate und Glukoside.

Übersicht.

Grundzüge der Einteilung.

Bei der Einteilung des reichen Versuchsmateriales, über welches die Enzymchemie jetzt schon verfügt, sind dem Verfasser folgende Gesichtspunkte massgebend gewesen:

Was bis jetzt an allgemeinen Gesetzen, Beziehungen und Regelmässigkeiten bekannt gewesen ist oder bei der Durcharbeitung gefunden werden konnte, ist im ersten Band dieses Buches zusammengestellt worden. Jener Band sollte den Ansatz zu einer theoretischen Enzymologie bilden, welche das feste Gerüst unserer Wissenschaft werden muss. Eine moderne Naturwissenschaft strebt zur Theorie nicht allein um das Kausalitätsbedürfnis des Forschers zu befriedigen, sondern auch der nunmehr verbreiteten Einsicht folgend, dass die Theorie, indem sie die vielen, verschlungenen Einzelbeziehungen entwirrt und klarlegt, auch für den Praktiker das zweckmässigste, Zeit und Energie sparende Mittel zur Beherrschung der Tatsachen bildet.

Indessen ist das theoretische Lehrgebäude der Enzymologie erst im Werden. Zahlreiche Tatsachen stehen noch vereinzelt, und unter diesen gewiss auch solche, welche für den Forscher, für den Arzt und den Techniker nicht minder wertvoll sind als andere, welche bereits ihren festen Platz in der Theorie gefunden haben. Die Geschichte zeigt uns, dass für die Entwickelung einer Wissenschaft oft gerade diejenigen Tatsachen von Wert sind, welche mit den geläufigen allgemeinen Anschauungen nicht in Zusammenhang oder in Übereinstimmung gebracht werden können. In diesem Sinne sind im vorliegenden Band alle Tatsachen zusammengestellt worden, welche dazu beitragen können, ein richtiges und vollständiges Bild von den einzelnen Enzymen zu liefern.

In der Überzeugung, dass wir gar nicht oft genug auf die chemischen Grundlagen unserer Wissenschaft zurückgehen können, ist bei jedem Enzym einleitend das Substrat und der chemische Vorgang bei seiner Verwandlung behandelt worden.

Über das Vorkommen der Enzyme werden nur insoweit Angaben gemacht, als solche für die Chemie der Enzyme von Wert sind, in erster

Linie für die Darstellung von Enzympräparaten. Keineswegs ist also hinsichtlich der Angaben über das Vorkommen eine Vollständigkeit angestrebt worden; man findet diesbezügliche, sehr dankenswerte Zusammenstellungen in dem bekannten Buch von C. Oppenheimer: Die Fermente und ihre Wirkungen (Leipzig, 4. Aufl. 1913), auf welches auch wegen sonstiger vorwiegend physiologisch interessanter Einzelheiten verwiesen sei.

Durchgehends ist versucht worden wenigstens eine brauchbare Darstellungsmethode für jedes Enzym anzugeben.

Unter den vielen Messungen über die Dynamik der Enzymreaktionen kann natürlich nur ein kleiner Teil wiedergegeben oder ausführlicher referiert werden; dabei sind ohne historische Rücksicht unter den jetzt vorliegenden Versuchsreihen einige zuverlässige und besonders typische Messungen ausgewählt worden.

Auch über den Einfluss der Temperatur findet man bei jedem Enzym eine Auswahl der genauesten Angaben.

Hervorgehoben wurde die Bedeutung der chemischen Aktivatoren und Paralysatoren, der Salze und besonders der Azidität, deren Ausserachtlassung früher so viele Widersprüche in der enzymologischen Literatur verursacht hat.

Schliesslich findet man bei jedem Enzym die wichtigsten Methoden zur Messung seiner Wirksamkeit zusammengestellt und besprochen.

Nomenklatur.

Bei der bereits grossen und sich rasch vermehrenden Zahl der bekannten Enzymwirkungen ist eine rationelle Nomenklatur notwendig. Nach einem Vorschlag von Duclaux (vgl. Bourquelot, Les ferments solubles, Paris 1896) wird der Name des Enzyms von demjenigen Stoff abgeleitet, auf welchen er wirkt; so z. B. ist Laktase dasjenige Enzym, welches Laktose spaltet. Leider wird von diesem Prinzip noch vielfach abgegangen.

Ist der aus dem Substrat abgeleitete Name nicht eindeutig, so ist nach dem Vorschlag von E. O. von Lippmann[1]) sowohl der Stoff welcher zerlegt wird, als auch das (Haupt)-Produkt der Spaltung zur Namengebung heranzuziehen; z. B. wäre hiernach Amylo-Maltase das Enzym, welches Maltose aus Stärke bildet. Da nun aber dieses Enzym keine Maltase ist, sondern vielmehr zur Klasse der Amylasen gehört, so wäre es wohl zweckmässiger, einen solchen Stoff als Malto-Amylase zu bezeichnen.

Synthetisierende Enzyme sollen nach einem Vorschlag des Verfassers[2]) nach demjenigen Stoff bezeichnet werden, welchen sie bilden, und sie

---

[1]) von Lippmann, Chem. Ber. 36, 331; 1903 und Chem. Ztg. 38, 81; 1914. — Vergl. auch Buchner und Meisenheimer, Chem. Ber. 38, 621; 1905.

[2]) Euler, H. 74, 13; 1911.

sollen als Katalysatoren von Synthesen durch die Endsilbe „ese" gekennzeichnet werden; demgemäss wäre Phosphatese dasjenige Enzym, welches organische Phosphate (Phosphorsäureester) synthetisiert. Dieser Vorschlag ist aus rein praktischen Gesichtspunkten veranlasst und soll über die Beziehungen von synthetisierenden und hydrolysierenden Enzymen, besonders über die Frage, ob an synthetisierenden und spaltenden Wirkungen bei umkehrbaren Enzymreaktionen ein Enzym oder zwei Enzyme beteiligt sind, nichts aussagen.

Allgemein angenommene Namen, wie Pepsin, Zymase, Trypsin, Erepsin sind um so eher beibehalten worden, als es klar ist, dass hier keine einheitlichen Enzyme vorliegen, sondern Enzymkomplexe, deren Komponenten zum grössten Teil noch nicht so genau definiert sind, dass die Einführung einer rationellen Namengebung schon zweckmässig wäre. Emulsin, Zymase sind Bezeichnungen für gebräuchliche Enzympräparate, welche eine Anzahl verschiedener enzymatischer Stoffe enthalten; wünschenswert ist stets die Angabe der Herkunft, also Bezeichnungen wie Mandelemulsin, Schweinsdarmerepsin, Oberhefenzymase.

Systematik.

Die Grundlagen für die Systematik der Enzyme bilden, da über die Natur der Enzyme selbst sehr wenig bekannt ist, die chemischen Reaktionen, welche sie auslösen. Es ist zu erwarten, dass man einmal die Zusammengehörigkeit, welche sich aus der chemischen Wirksamkeit ergibt, bei der Beschreibung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der Enzyme wiederfinden wird.

Eine Aufzählung aller in der Literatur vorkommenden Enzyme, deren Individualität z. T. nicht genügend sichergestellt ist, liegt nicht im Rahmen dieser Arbeit.

Die folgende Zusammenstellung bezweckt, einen allgemeinen Überblick über diejenigen typischen Reaktionen zu geben, an deren Verlauf Enzyme beteiligt sind.

Reaktion	Substrat	Produkte	Enzym
Reaktionen $R \cdot H + HO \cdot R' \rightleftarrows R \cdot R' + H_2O$	Ester	Fettsäuren + Alkohole	Esterasen
	Fette	höhere Fettsäuren + Glyzerin	Lipasen
	niedere Ester	niedere Fettsäuren + Alkohole	Butyrasen
	Phosphorsäureester	R · OH + Phosphorsäure	Phosphatasen
	Fruktosediphosphat	Fruktose + Phosphorsäure	(Fruktose-) Phosphatase
	Zymohexose + Phosphat	Fruktosediphosphat	Phosphatese
	Phytin	Inosit + Phosphorsäure	Phytase
	Nukleotide	Nukleosid + Phosphorsäure	Nukleotidasen

Reaktion	Substrat	Produkte	Enzym
Reaktionen $R \cdot H + HO \cdot R' \rightleftarrows R \cdot R' + H_2O$	**Höhere Kohlehydrate**		
	Zellulose		Zellulase
	Hemizellulosen	Zellulosedextrine	Zytase
	Stärke, Glykogen	Maltose, (Dextrine)	Amylasen u. Glykogenasen
	Inulin	Fruktose	Inulinase
	Pektinstoffe	reduz. Zuckerarten	Pektinase
	Glukoside inkl. Polyosen	Hexosen u. Glukosidreste	
	α-Glukoside und α-Galaktoside	α-Glukose + Zucker-, Alkohol- oder Phenolrest	α-Glukosidasen (Maltase, Trehalase u. a.)
		α-Galaktose + Zucker-, Alkohol- oder Phenolrest	α-Galaktosidasen
	β-Glukoside	β-Glukose + Zucker-, Alkohol- oder Phenolrest	β-Glukosidasen (Emulsin)
	β-Galaktoside	β-Galaktose + Zucker-, Alkohol- oder Phenolrest	β-Galaktosidasen, Laktase
	Fruktoside	Fruktose + Zucker-, Alkohol- oder Phenolrest	Saccharase
	Nitril-Glukoside	Glukose + Oxynitrile	(Amygdalase)
	Myronsaures K	Glukose + $HKSO_4$ + C_3H_5NCS	Myronase
	Nukleoside	Pentosen + Nukleinbasen	Nukleosidasen
	Carbaminderivate		
	$R \cdot CO \cdot NH \cdot R'$	$R \cdot COOH + H_2N \cdot R'$	Carbamasen, Proteinasen
	Proteine	Albumosen, Peptone	Pepsine; Papain
	Proteine, Albumosen, Peptone, Peptide	Peptide, Aminosäuren	Trypsine
	Peptide	Aminosäuren	Peptasen, Erepsin
	Harnstoff	$CO_3(NH_4)_2$	Urease
	Arginin	Harnstoff + Ornithin	Arginase
	Nukleinsäure	Nukleinbasen + Zucker + Phosphorsäure	Nukleasen (Enzymkomplex)
Umkehrbare Alkoholyse	Chlorophyll + C_2H_5OH	Krist. Chlorophyll + Phytol	Chlorophyllase
Umkehrbare Spaltungen	Oxynitrile	Aldehyd + HCN	Nitrilasen
Nicht umkehrbare Spaltungen	Zymohexosen	Äthylalkohol + CO_2	„Zymase" (Enzymkomplex)
	Glukose	Milchsäure	Milchsäurebakterienzymase
	Brenztraubensäure (α-Ketosäuren)	Azetaldehyd + CO_2	Karboxylase
	Milchsäure	Äthylalkohol + CO_2	Laktazidase
	Hydroperoxyd	Molekularer Sauerstoff + H_2O	Katalase
Isomerisationen (Umlagerungen)	Hexosen	isomere Hexosen	Hexasen (Glukase etc.)
Sauerstoffübertragung	Peroxyde	Reduktionsprodukte der Peroxyde + O	Peroxydasen

Reaktion	Substrat	Produkte	Enzym
Oxydationen	Phenole	Chinone	Phenolasen
	Aldehyde	Säuren	Aldehydasen
	Alkohol	Essigsäure	Alkoholoxydase der Essigsäurebakterien
Cannizaro-Reaktion	Aldehyde	Alkohol + Säure	(Cannizaro-Enzym)
Schardinger-Reaktion	Akzeptor (Farbstoff oder Nitrat) + Aldehyd	Leuko-Farbstoff bzw. Nitrit	(Schardinger-Enzym)

Für die Einreihung der „koagulierenden“ Enzyme Pektase, Chymosin und Thrombin in die obige Übersicht fehlen bis jetzt die zuverlässigen chemischen Unterlagen, ebenso für die Systematik der an der Nukleinspaltung beteiligten Enzyme. Die Pektase wird im Anschluss an die Pektinase besprochen, Chymosin und Thrombin im Anschluss an die Proteinasen.

1. Kapitel.

Esterasen.

Die allgemeine Wirkung dieser Enzyme besteht in der Katalyse der Reaktion zwischen Karbonsäure-Estern und ihren Komponenten nach dem Schema:

$$R \cdot COO \cdot R' \rightleftarrows R \cdot COOH + HO \cdot R'.$$

Die Reaktion führt bekanntlich zu definierten Gleichgewichten (Berthelot und Péan de Saint Gilles): an ihr ist die Anwendbarkeit des Massenwirkungsgesetzes auf chemische Reaktionen zum erstenmal gezeigt worden (Guldberg und Waage, 1867; van't Hoff, 1877).

Die Einstellung des Ester-Gleichgewichts wird bekanntlich auch durch Säuren katalysiert und zwar ziemlich genau proportional der Konzentration der H-Ionen (vergl. Bd. 1, S. 103, 125).

Noch schneller als unter der Einwirkung von dissoziierten Säuren verläuft die Spaltung in Gegenwart von überschüssigen HO-Ionen, und zwar ebenfalls proportional der Konzentration dieser Ionen. Man bezeichnet diese Reaktion als Verseifung. Da durch die katalysierenden, HO-Ionen liefernden Basen die aus den Estern entstehenden Säuren neutralisiert werden, so verläuft die Verseifung, im Gegensatz zur Hydrolyse, vollständig bis zum Verbrauch des Esters oder der Base.

Die verschiedenen Ester werden durch die gleichen Katalysator-Mengen mit sehr verschiedenen Geschwindigkeiten gespalten. Man findet vergleichende Messungen über die Hydrolysen durch HCl bei de Hemptinne und Löwenherz[1]), über Verseifungsgeschwindigkeit bei Reicher[2]). Da der Vergleich mit den bei den enzymatischen Spaltungen gewonnenen Zahlen interessant ist, so setze ich einige Resultate von Löwenherz hierher:

Geschwindigkeitskonstanten k der Spaltung durch 0,1 n · HCl bei 40°.

Ester	$k \cdot 10^4$	Ester	$k \cdot 10^4$
Ameisensaures Äthyl	1100	Essigsaures Methyl	55
Essigsaures Äthyl	57	Essigsaures Äthyl	57
Buttersaures Äthyl	35	Essigsaures Propyl	56
Isobuttersaures Äthyl	34		
Valeriansaures Äthyl	12		
Benzoesaures Methyl	0,8	Essigsaures Phenyl	33

[1]) Löwenherz, Zs f. physik. Chem. 15, 389; 1894.

[2]) Reicher, Lieb. Ann. 228, 257; 1885.

Neutrale Ester mehrwertiger Säuren oder mehrwertiger Alkohole werden stufenweise gespalten, wobei jede Reaktionsstufe ihre besondere Geschwindigkeitskonstante besitzt. (Vergl. Bd. I, S. 129, Stufenweise Reaktionen.)

Glyzerinester höherer Fettsäuren sollen im allgemeinen durch Alkali und durch Lipasen schneller verseift werden als die entsprechenden Äthylester (H. H. Franck).

Eine von Falk und Nelson[1]) sowie später von Hamlin[2]) untersuchte Katalyse durch Aminosäuren bedarf noch weiterer Aufklärung.

Zu einer endgültigen, rationellen Einteilung der Esterasen auf Grund ihrer chemischen Wirksamkeit reicht das vorliegende experimentelle Material noch nicht aus. Dagegen empfiehlt sich eine vorläufige Scheidung in zwei Gruppen:

A. Tierische Esterasen,
B. Pflanzliche Esterasen.

Wir folgen hierin dem Vorgang von W. Connstein, dessen vor 17 Jahren erschienene Monographie „Über fermentative Fettspaltung"[3]) immer noch sehr lesenswert ist.

Bei keiner dieser beiden Gruppen ist eine Einheitlichkeit gewährleistet oder auch nur wahrscheinlich, wie unten näher ausgeführt wird. Beide Gruppen zeigen Unterschiede in der Wirksamkeit gegenüber verschiedenen Estern. Eine Trennung in

1. Lipasen, welche die eigentlichen Fette und Öle (Triglyzeride der höheren Fettsäuren) spalten,
2. Butyrasen, welche vorzugsweise die Ester niedrigerer Fettsäuren mit ein- oder mehrwertigen Alkoholen angreifen,

liegt bei den pflanzlichen Esterasen nahe, lässt sich aber bei den tierischen Esterasen schwer durchführen. Nach Rona und Bien entfalten im allgemeinen die Butyrasen ihre Wirkung im homogenen System, die Lipasen im heterogenen System, und tatsächlich scheint ein Zusammenhang zwischen Löslichkeit, Dispersitätsgrad und Wirkungsbereich bei den Esterasen zu bestehen.

A. Tierische Esterasen.

Das sicherste Einteilungsprinzip ist gegenwärtig die Azidität der optimalen Wirksamkeit.

Nach der Untersuchung von Davidsohn[4]) besitzt das im Magen vom Säugling vorkommende Enzym ein Wirksamkeitsoptimum bei $p_H = 5—4$, während für Esterasen aus Pankreas, Darm, Blutserum und Frauenmilch ein

---

[1]) Falk u. Nelson, Jl Amer. Chem. Soc. 34, 828; 1912.
[2]) Hamlin, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 624; 1913.
[3]) Connstein, Ergebn. d. Physiol, 3, 194; 1904.
[4]) Davidsohn, Biochem. Zs 49, 249; 1913.

Optimum bei $p_H = 7—8,6$ gefunden wurde. Das Magenenzym weicht also von den übrigen, wenigstens in dieser Hinsicht, übrigens auch noch anderweitig, deutlich ab, und es scheint ein Unterschied zwischen diesen und den übrigen Esterasen zu bestehen, welcher an denjenigen zwischen dem proteolytischen Enzym des Magens, dem Pepsin, und dem Trypsin des Pankreas, Darmes und Serums erinnert.

Demgemäss wird zunächst die Magen-Esterase einzeln behandelt.

1. Magen-Esterase.

Die Magenesterase, die im Pawlowschen Magensaft vorkommt, ist zweifellos eine eigentliche Lipase, d. h. sie spaltet Fett[1]). Von grossem Einfluss ist hierbei, wie immer bei Reaktionen im heterogenen System, die Grösse der Oberfläche des Substrates, also hier der Emulsionsgrad des Fettes[2]). Als Substratemulsionen kommen hier in Betracht: Eigelb, Milch, Mandelmilch, Lebertran, Emulsion von Ölen in Seifen. Neben eigentlichen Fetten werden auch die Lipoide, Lezithin, Jekorin und Protagon angegriffen[3]). Ferner ist die Magenesterase wirksam gegenüber Glyzeriden und Alkoholestern niederer Fettsäuren.

Vorkommen. Es kann nunmehr als sichergestellt gelten, dass die Magenlipase in der Sekretion des Magens selbst enthalten ist[4]), dass also der Duodenalsaft höchstens einen Teil des im Magen wirksamen fettspaltenden Enzymes liefert. Die wirksame Magenlipase wird vom Fundusteil abgeschieden (Volhard).

Den Nachweis der Spaltung von Neutralfett im Magen verdankt man Marcet (1858) und Cash (1880).

Auch die Magenschleimhaut enthält Lipase, was Ibrahim und Kopec[5]) beim Fötus nachgewiesen haben. Wirksame Glyzerinextrakte sind mehrfach beschrieben worden. In wässerigen Auszügen hat man Butyrasewirkung nachgewiesen.

Bei Magenkrebs und Achylie soll der Magensaft kein Fettspaltungsvermögen besitzen[6]).

Enzymmaterial und Darstellung. Die interessantesten Versuche sind mit Magensaft angestellt, welcher bekanntlich am besten mit der von

[1]) Volhard, Zs klin. Med. 42, 414; 43, 397; 1901. — Stade, Hofm. Beitr. 3, 291; 1902. — Fromme, Hofm. Beitr. 7, 51; 1905. — Zinsser, ebenda 7, 31; 1905.

[2]) Siehe hierzu auch Laqueur, Hofm. Beitr. 8, 281; 1906.

[3] P. Mayer, Biochem. Zs 1, 81; 1906.

[4]) Siehe auch Bickel, Deutsche med. Woch. 32, 1323; 1906. — Falloise, Arch. internat. de Physiol. 3, 396 und 4, 87; 1906. — Heinsheimer, Deutsche med. Woch. 32, 1194; 1906. — London u. Wersilowa, H. 56, 545; 1908. — Dass beim normalen Menschen Duodenalinhalt in den Magen zurückfliesst, betont neuerdings auch O. Gross (Dtsch. Arch. Klin. Med. 132, 121; 1920).

[5]) Ibrahim u. Kopec, Zs Biol. 53, 201; 1906.

[6]) v. Pesthy, Biochem. Zs 34, 147; 1911.

Pawlow[1]) angegebenen Methodik gewonnen wird. (Bd. I, S. 8.) Zu Versuchen, wo es sich darum handelt, kräftige, reproduzierbare Wirkungen zu erhalten, ist jedenfalls die Verwendung von Magensaft derjenigen von Glyzerinextrakten der Magenschleimhaut entschieden vorzuziehen.

Inouye hat mit Glyzerinextrakten von Magenschleimhaut überhaupt keine Wirkungen auf Fettemulsionen erhalten. Etwas erfolgreicher ist Fromme unter Volhards Leitung gewesen. Er hat mit der Schleimhaut von Schweine- und Hundemagen gearbeitet, und zwar mit dem Fundusteil. Man kann entweder die Magenschleimhaut-Trockensubstanz nach Verreiben mit Glyzerin auf Fettemulsion wirken lassen, oder die Verreibung mit verdünntem Alkali vornehmen.

Häufiger ist frische Schleimhaut angewandt worden. Die Schleimhaut wird einige Stunden nach der Schlachtung abgezogen, der Fundus- vom Pylorusteil getrennt. Der Fundusteil wird fein zerhackt und durch Gaze

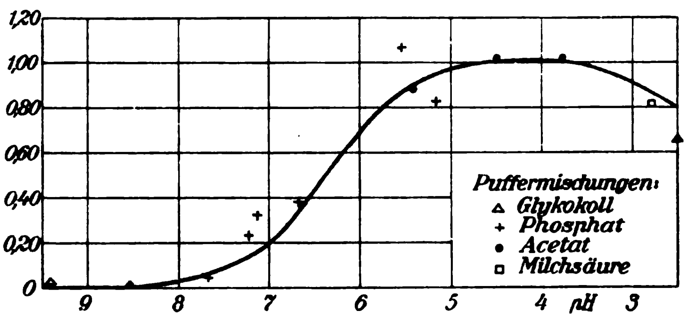


Fig. 1.

koliert. Er wird mit 2 Teilen Glyzerin extrahiert; das Extrakt ist aber erst nach mehrtägigem Stehen wirksam (Fromme).

Aziditätsbedingungen. Über die Säure- und Alkalienempfindlichkeit der Magenlipase hat Volhard (l. c.) die ersten eingehenderen Versuche angestellt. Mit der modernen Methodik von Sörensen und Michaelis hat dann Davidsohn[2]) die Magenesterase mit der Pankreasesterase und der Serumesterase verglichen. Die Versuche waren an Tributyrin mit der stalagmometrischen Methode von Rona und Michaelis[3]) (vergl. S. 45) ausgeführt. Davidsohn erhielt für Lipase des Magensaftes menschlicher Säuglinge die Aziditätskurve der Figur 1.

Man sieht, dass die Magenlipase ein ziemlich breites Aziditäts-Optimum im Gebiet pH = 5 — 3 besitzt.

Im allgemeinen erinnert die Kurve an die von Sörensen u. Michaelis für Saccharase erhaltene (Bd. I, S. 30).

---

[1]) Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden, Bergmann, 1898.
[2]) Davidsohn, Biochem. Zs 45, 284; 1912.
[3]) Rona u. Michaelis, Biochem. Zs 31, 345; 1911.

Davidsohn zieht auch aus der obigen Kurve analoge Schlüsse wie Michaelis aus derjenigen für Saccharase: Er fasst dieselbe als Dissoziationsrestkurve auf; indem er die Magenlipase als einen Ampholyten betrachtet, entnimmt er der Kurve den Wert für die Säuredissoziationskonstante $K = 4{,}5 \cdot 10^{-7}$, und schätzt die basische Dissoziationskonstante zu $K = 10^{-12}$.

Nach Davidsohn[1]) und Salge[2]) liegt die Azidität des Säuglingsmagens auf der Höhe der Verdauung durchschnittlich in einem Bereich von pH = 6—4; die Lipase kann also darin gut zur Wirkung kommen.

Umwandlung des Zymogens in das Enzym. Nach Volhard besteht zwischen dem Pepsin und der Lipase des Magens, abgesehen davon, dass beide am besten in saurer Lösung wirken, auch insofern eine Analogie, als beide in den Drüsen als Zymogen vorhanden sein sollen (weshalb auch der Glyzerinextrakt der Schleimhaut zunächst Zymogen enthalte), während sich im Magensaft sowohl Pepsin als Lipase im Enzymstadium befinden. In dieser Weise deutet Volhard die verschiedene Empfindlichkeit der Lipase im Magensaft und des Glyzerinextraktes der Schleimhaut.

Aktivatoren. Bemerkenswert ist, dass Magenesterase im Gegensatz zur Pankreasesterase (siehe S. 16) durch Galle nicht aktiviert wird.

Paralysatoren. NaF hemmt spezifisch Esterasen (Loevenhart u. Pierce), aber nach Davidsohn (Biochem. Zs 45) Magenesterase erheblich weniger als Pankreasesterase; letzterer Forscher fand für die Spaltung von Tributyrin bei einer Konzentration von 1 Tl. NaF in 400 Tln. Wasser, also 0,25% oder 0,06 n, eine Hemmung von 66%. Vergl. hierzu die Wirkung auf Pankreasesterase S. 19.

Zeitlicher Verlauf und Dynamik der Fettspaltung durch Magensaft.

Eine grosse Anzahl älterer Versuche verdankt man Volhard und seinem Schüler Stade (l. c.). Stade hat seine Versuche mit Eigelb als Substrat unter Benutzung der Volhardschen Methodik (S. 43) ausgeführt, bei welcher die Menge der abgespaltenen Fettsäure bestimmt wird.

Ob stets die optimale Azidität eingehalten war, lässt sich schwer beurteilen.

Es liegt ein ausgesprochen mikroheterogenes Reaktionssystem und gleichzeitig eine umkehrbare Reaktion vor. Über den erreichbaren enzymatischen Endzustand ist nichts bekannt (vergl. Bd. I, S. 209) und auch über das natürliche Gleichgewicht bei Fetten sind wir wenig unterrichtet. Unter den von Stade gewählten Versuchsbedingungen scheint die Reaktion nicht zu Ende zu verlaufen, wobei möglicherweise auch eine Enzymhemmung durch die Spaltprodukte mitwirkt.

---

[1]) **Davidsohn, Zeitschr. f. Kinderheilk. 2, 420; 1911 und 4, 208; 1912.**

[2]) **Salge, ebenda 4, 171; 1912.**

Dies geht auch aus den Versuchen über den zeitlichen Verlauf der Reaktion hervor (**Stade**, l. c. S. 305), wie aus folgenden Figuren deutlich wird.

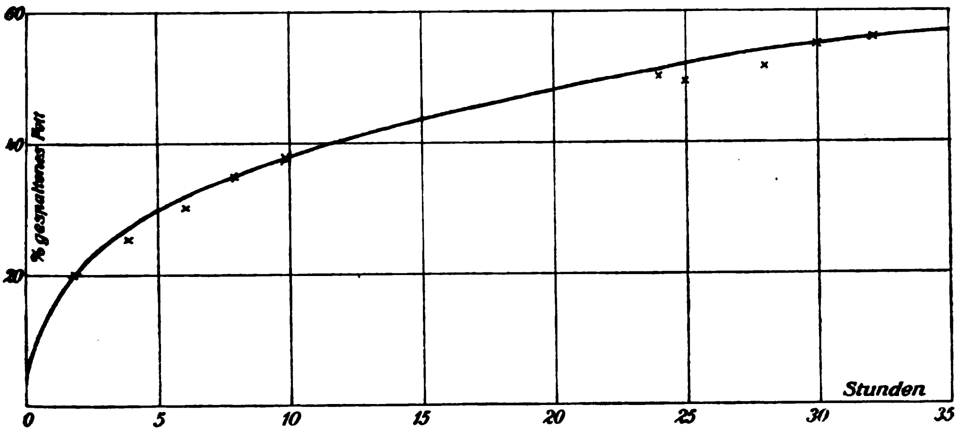


Fig. 2a.

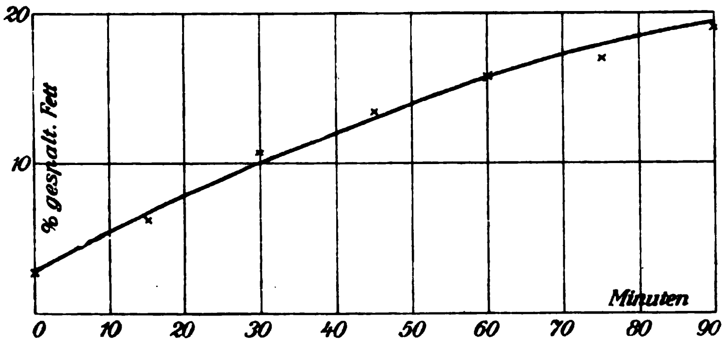


Fig. 2b.

Bei verhältnismässig geringen Fettmengen war die in vier Stunden gebildete Säuremenge direkt proportional der angewandten Fettmenge, wie folgende Tabelle zeigt (Versuchsreihe 12):

Versuchsanordnung			Enzymatisch abgespaltene Fettsäuremenge in %
Eigelblösung ccm	Magensaft ccm	H_2O ccm	x
10,0	5	—	21,2
7,5	5	2,5	22,7
5,0	5	5,0	22,4
1,0	5	9,0	22,5

Bei grösseren Fettmengen wird prozentisch immer weniger Fettsäure abgespalten.

Was den Einfluss der Enzymmenge auf die zu einer gewissen Zeit gespaltene Substratmenge, bzw. auf die zur Erreichung eines gewissen Spaltungs-

grades erforderliche Zeit betrifft, so hat Volhard die Gültigkeit der sog. Schützschen Regel angenommen (Bd. I, S. 124)

$$x = \varkappa \sqrt{E} \qquad \text{bzw.} \qquad x = \varkappa_1 \sqrt{t}$$

(x = umgesetzte Substratmenge, E = angewandte Enzymmenge, t = Zeit).

Die der Versuchsreihe Nr. 15 entnommenen Werte für x der folgenden Tabelle gelten für 24 Stunden und 40°. Die in der letzten Spalte enthaltenen $\varkappa$-Werte zeigen den Grad der Annäherung an die Schützsche Regel.

Versuchsanordnung			Enzymatisch gespaltene Fettsäuremenge in %	
Magensaft E ccm	Eigelb ccm	H_2O ccm	x	$\frac{x}{\sqrt{E}} = \varkappa$
25	100	–	24,5	4,9
16	100	9	19,5	4,9
9	100	16	15,0	5,0
4	100	21	8,5	4,3
1	100	24	4,7	4,7

Bei weitergehender Spaltung stimmt die Regel von Schütz weniger gut mit den in den Figuren 2 wiedergegebenen Zahlen Stades.

Arrhenius[1]) hat die Versuchsreihe 10 nach der von ihm abgeleiteten Formel berechnet

$$a \ln \frac{a}{a-x} - x = \varkappa P t$$

(a = anfängliche Substratmenge, P = E = Enzymmenge; siehe Bd. I, S. 125 u. ff.)

Stunden	x beobachtet	x berechnet	
2	0,204	0,186	$\varkappa P = 10$
4	0,256	0,257	
6	0,298	0,308	
8	0,353	0,348	
10	0,376	0,383	
25	0,495	0,552	
29	0,515	0,582	
31	0,554	0,596	
35	0,609	0,620	
75	0,775	0,784	

2. Pankreas-Esterase.

Den Nachweis der Fettspaltung durch den Pankreassaft verdankt man Claude Bernard (1856). Ausser Neutralfetten werden auch niedere Ester hydrolysiert; die Frage, ob es sich hierbei um ein und dasselbe Enzym handelt, ist von Terroine[2]) und auch neuerdings von Abderhalden[3]) im bejahenden Sinne beantwortet worden.

---

[1]) Arrhenius, Immunochemie, Leipzig 1907, S. 82.
[2]) Terroine, Jl de Physiol. et Pathol. gén. 13, 857; 1911.
[3]) Abderhalden u. Weil, Fermentf. 4, 76; 1920.

Morel und Terroine[1]) haben die Angreifbarkeit verschiedener Ester durch Pankreassaft verglichen. Die Spaltungsgeschwindigkeit der Äthylester der ein- und zweibasischen gesättigten Fettsäuren nimmt von der Essigsäure und Malonsäure bis zur Buttersäure bzw. Glutarsäure zu, dann wieder ab, analog hat die Angreifbarkeit der verschiedenen Essigester ihr Maximum beim Butylalkohol. Bei den Triglyzerinestern steigt die Spaltbarkeit vom Triazetin bis zum Trilaurin und fällt dann stark bis zum Tristearin; leichter als dieses wird Triolein gespalten.

Bemerkenswert ist, dass Pankreassaft die Ester normaler Fettsäuren bedeutend schneller spaltet als diejenigen der entsprechenden Isosäuren, was für die Katalyse durch HCl nicht zutrifft (vgl. S. 6). Auch die Ester halogenisierter Fettsäuren werden angegriffen (Terroine. — Abderhalden u. Weil).

Die Angaben von Nencki und Lüdy[2]), dass auch Salizylsäurephenylester (Salol) durch Pankreasenzym zerlegt wird, wurden nicht bestätigt; Chanoz und Doyon[3]) erhielten negative Resultate. Nach Loevenhart[4]) ist zur Spaltung durch Amylsalizylase die Mitwirkung von Gallensalzen erforderlich. Morel und Terroine konnten auf Methylsalizylat und Benzoat nur sehr schwache Wirkung erhalten.

Nach Angabe von Abderhalden und Weil (l. c.) soll das fettspaltende Enzym des Rinderpankreas in seiner Wirkung unspezifisch sein, d. h. unabhängig von der sterischen Isomerie der Fette und somit keine asymmetrische Spaltung razemischer Substrate bewirken. Man vergleiche dieses negative Ergebnis mit den Befunden von Dakin an Leberesterase (Bd. I, S. 256).

Enzymmaterial.

Alle Erfahrungen zeigen, dass für Arbeiten mit Pankreasesterase am geeignetsten der Pankreas-Saft selbst gewählt wird, dessen enzymatische Fähigkeit diejenige von Pankreas-Extrakten sehr erheblich übertrifft. Anscheinend ist der Pankreassaft aller höheren Tiere wirksam, so z. B. von Rind, Schwein und Kaninchen[5]).

Steht Pankreassaft nicht zur Verfügung, so kann mit der Pankreasmazeration gearbeitet werden.

Sowohl die Menge des Pankreassekretes als auch dessen fettspaltende Wirksamkeit wird den Ergebnissen von Pawlow und Walther zufolge durch Fettgenuss, z. B. Einführung von Milch, stark angeregt. Dagegen fand Lombroso[6]) keine Anpassung an die Nahrung.

---

[1]) Morel u. Terroine, Jl de Physiol. et Pathol. gén. 14, 58; 1912.
[2]) Lüdy, Arch. f. exp. Pathol. 325, 47; 1889.
[3]) Chanoz u. Doyon, Jl de Physiol. et Pathol. gén. 2, 695; 1900.
[4]) Loevenhart, Jl Biol. Chem. 2, 391; 1906. — Magnus, H. 42, 169 u. 48, 376; 1906.
[5]) Rachford, Jl Physiol. 12, 72; 1891.
[6]) Ugo Lombroso, Arch. de Fermac. sper. 13, 73; 1912.

Eine brauchbare Vorschrift zur Herstellung eines Pankreasesterasepräparates hat Pottevin[1]) angegeben. Nach dem gleichen Prinzip hat Dietz[2]) gearbeitet.

Pankreasdrüsen vom Schwein werden in einer Fleischhackmaschine fein zerhackt; das Produkt wird so lange mit 96⁰/₀igem, dann mit absolutem Alkohol behandelt, bis den Gewebsteilen das Wasser entzogen ist. Man zerhackt nochmals mit der Maschine, um einen noch höheren Feinheitsgrad zu erreichen. Der Alkohol wird möglichst vollständig entfernt und der Rückstand im Soxlethschen Extraktionsapparat mit Äther vollständig entfettet. Schliesslich saugt man den Äther ab und trocknet im Luftstrom.

Die so hergestellten Enzympräparate erwiesen sich nach Dietz' Angaben zunächst wenig haltbar, sie wurden mit der Zeit sauer. Um dies zu verhindern, wurden dem Präparat die darin enthaltenen proteolytischen Enzyme mit Wasser entzogen. Man breitet zu diesem Zweck das Präparat auf ein grosses Nutschenfilter aus, übergiesst mit kaltem Wasser und saugt stark ab. Das Auswaschen geschieht so lange, bis das Filtrat mit verdünnter Essigsäure keinen weisslichen Niederschlag mehr gibt. Das Wasser darf mit dem Präparat nicht lange in Berührung sein, weil dieses sonst aufquillt und das Filter verstopft; deswegen gibt man immer nur kleine Portionen Wasser zu und lässt diese erst abfliessen, ehe man neues Wasser aufgiesst. Man trocknet das Präparat mit Alkohol und Äther und macht es durch Sieben homogen.

E. Baur[3]) hackt die frischen, von ihrer Fett- und Bindegewebshülle befreiten Schweinepankreasdrüsen, übergiesst den Brei mit der doppelten Menge Alkohol, lässt 1 Tag stehen, koliert und presst stark. Die trübe Brühe, welche die wirksamen Drüsenzellen enthielt, wird mit Äther gefällt, der Drüsenschlamm wird abgenutscht und mit Äther gewaschen.

Wird das Präparat wirklich trocken gehalten, so behält es seine Wirksamkeit während Monaten unverändert bei.

Zur Gewinnung einer reichlichen Menge Pankreassaft wird dem Fistelhund nach Bayliss und Starling Sekretin eingespritzt. In dieser Weise wurde mit Erfolg von Terroine[4]) sowie von Loevenhart und Souder[5]) verfahren.

Dass die zerkleinerte Pankreasdrüse selbst eine starke fettspaltende Wirkung ausübt, hat schon Nencki 1886 gefunden. Steht Pankreassaft nicht zur Verfügung, so soll zur Fetthydrolyse frischbereitete Mazeration der

[1]) Pottevin, C. r. 137, 378; 1904.
[2]) Dietz, H. 52, 296; 1907.
[3]) E. Baur, Zs angew. Chem. 22, 97 u. 305; 1909.
[4]) Terroine, Biochem. Zs 23, 404; 1910.
[5]) Loevenhart u. Souder, Jl Biol. Chem. 2, 415; 1910.

Pankreasdrüse verwendet werden, wie Connstein empfiehlt und seitdem oft geschehen ist[1]).

Mit einem Presssaft hat v. Pesthy[2]) gute Resultate erzielt; er hackt frisches, von Bindegeweben und Fett befreites Rindspankreas mit der Fleischhackmaschine, zerreibt mit Quarzsand und ein wenig Wasser zu feinem Brei und presst in einer hydraulischen Presse bei 300 Atmosphären ab.

J. H. Long und Fenger[3]) haben versucht den Pankreaspresssaft durch Zentrifugieren in Fraktionen zu zerlegen.

Aus dem frischen Pankreas kann durch Entwässern leicht ein wirksames Trockenpräparat erhalten werden. Aus dem feingehackten Material wird mit Alkohol das Wasser entfernt, hierauf das Fett mit Äther extrahiert. Durch erneute Extraktionen mit Wasser, Alkohol und Äther wird das Präparat verbessert. Das durch Sieben gewonnene feine Pulver liefert mit Wasser verrührt, eine kräftig wirkende Emulsion.

Vielfach ist Pankreatin der Rhenania-Werke in Aachen zur Herstellung von Aufschlämmungen verwendet worden.

Was Glyzerin- oder Wasserextrakte von Pankreasmaterial betrifft, so stimmen nunmehr alle Autoren darin überein, dass dieselben keine Lösungen, sondern Suspensionen des Enzyms sind[4]). Es ist leicht verständlich, dass diese Suspensionen hinsichtlich ihres Dispersitätsgrades in sehr ungleichförmigem Zustand erhalten werden und dass dadurch wiederum ihre Haltbarkeit, Filtrierbarkeit und Empfindlichkeit gegen äussere Einflüsse stark wechselt. Durch Filtrieren werden die Pankreasextrakte mehr oder weniger stark geschwächt[5]).

Glyzerinextrakte werden im allgemeinen durch Verrühren des Pankreasmaterials der zwei- bis fünffachen Menge Glyzerin dargestellt, und zwar benützt man hierzu entweder frischen Pankreas[6])[7])[8])[9])[10]) oder Trockenpräparat[10]). Durch Glyzerinextraktion von Pankreatin-Rhenania hat Engel (siehe S. 21) kräftige Auszüge erhalten.

Glyzerinextrakte von Pankreas enthalten neben Esterase auch tryptische Enzyme, welche, besonders in wässeriger Lösung, die Esterasen zerstören (Terroine[11]), Mellanby and Wooley[12]); Shaw-Mackenzie l. c., Tsuji[13])).

---

[1]) Abderhalden u. Weil, Fermentforsch. 4, 76; 1920.

[2]) v. Pesthy, Biochem. Zeitschr. 34, 147; 1911.

[3]) Long u. Fenger, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 2213; 1915. — Siehe auch Long, Mary Hull u. H. V. Atkinson, ebenda 2427. — R. A. Nelson u. Long, ebenda 39, 1766; 1917.

[4]) Siehe hierzu auch Berczeller, Biochem. Zs 34, 170; 1911.

[5]) Siehe z. B. Pekelharing, H. 81, 355; 1912.

[6]) Kanitz, H. 46, 482; 1905.

[7]) de Souza, Biochem. Jl 10, 108; 1916.

[8]) Rosenheim u. Shaw-Mackenzie, Jl of Physiol. 40, Proc. VIII, 1910.

[9]) Shaw-Mackenzie, Jl of Physiol. 49, 216; 1915.

[10]) Hamsik, H. 71, 238; 1911.

[11]) Terroine, Biochem. Zs 23, 404; 1910.

[12]) Mellanby u. Wooley, Jl of Physiol. 48, 287; 1914.

[13]) Tsuji, Biochem. Jl 9, 53; 1915.

In Glyzerinlösungen, welche übrigens jahrelang haltbar sind (de Souza, l. c.), ist die tryptische Wirkung durch das Glyzerin gehemmt.

Loevenhart und Peirce[1]) haben Wasserextrakte hergestellt. Sie verrieben 1 g Schweinepankreas mit 75 ccm Wasser und setzten 2 ccm 0,05 n. NaOH zu; die Mischung wurde auf 38° erwärmt; ein Zusatz von 3 ccm Buttersäure erzeugte Fällung in der opaleszenten Flüssigkeit, wobei ihre enzymatische Wirksamkeit vermindert wurde.

Spezifische Aktivatoren (Co-Enzyme).

Es kann nunmehr als festgestellt angesehen werden, dass die Pankreasesterase in einem an sich unwirksamen Zustande sezerniert und erst durch einen besonderen Stoff aktiviert wird (Übergang von Zymogen in Enzym). Dass diese Aktivierung durch die Gallensalze[2]) zustande kommt ist durch die Arbeiten von Magnus[3]), v. Fürth und Schütz[4]), Donath[5]) u. a. bewiesen worden. Die Wirkung der Gallensalze erscheint auch insofern spezifisch, als weder die Magenlipase (Laqueur[6])) noch die Darmlipase (Boldyreff[7])) durch dieselben beeinflusst wird.

Sowohl die synthetische als die spaltende Wirkung der Pankreasesterase wird durch die Gallensalze befördert[8]), während andere Aktivatoren, wie die Salze der alkalischen Erden nur die Spaltung beeinflussen (Pekelharing, l. c.).

Andererseits werden auch andere Pankreasenzyme durch Gallensalze aktiviert: Dass Galle auch einen Aktivator für Trypsin enthält, ist seit langer Zeit bekannt (Rachford 1899; Delezenne; v. Fürth u. Schütz; Wohlgemuth; siehe unter Pankreastrypsin). Auch die Wirkung der Amylase wird durch Gallensalze verstärkt (Wohlgemuth, Biochem. Zs 21; Buglia, Biochem. Zs 25). Es bleibt also noch zu untersuchen, in welchem Grad Gallensalze spezifische Kinasen der Pankreasesterase sind[9]).

Die Frage, welche Bestandteile der Galle die aktivierende Wirkung ausüben, ist vielfach bearbeitet worden. Hewlett[10]) und später Küttner[11]) schrieben dem Lezithin der Galle eine wesentliche Rolle zu; auch Loeven-

---

[1]) Loevenhart u. Peirce, Jl Biol. Chem. 2, 397; 1906.

[2]) Auch mit den Natriumsalzen der synthetischen Glykocholsäure und Taurocholsäure wird der gleiche Effekt erzielt.

[3]) Magnus, H. 48, 373; 1906.

[4]) v. Fürth u. Schütz, Hofm. Beitr. 9, 28; 1906.

[5]) Donath, Hofm. Beitr. 10, 390; 1907.

[6]) Laqueur, Hofm. Beitr. 8, 281; 1906.

[7]) Boldyreff, Zbt f. Physiol. 18, 460; 1904. — H. 50, 394; 1907.

[8]) Siehe hierzu Hamsik, H. 65, 232; 1910. — Donath (siehe Anm. 2) hatte negative Ergebnisse erhalten.

[9]) Siehe hierzu auch Temminck Groll, Nederl. Tijdschr. v. Geneesk. 64, 1157; 1920 und Arch. Néerl. de Physiol. 4, 382; 1920.

[10]) Hewlett, John Hopkins Hosp. Bull. 16, Nr. 166.

[11]) Küttner, H. 50, 472; 1907.

hart und Souder (l. c.) fanden eine starke Beschleunigung durch Lezithin, Indessen zeigen die Versuche von O. v. Fürth und Schütz[1]), dass die Wirkung der Galle nicht auf ihren Lezithingehalt zurückgeführt werden kann.

Terroine (l. c.) hat an Triazetin die Wirkung der Gallensalze auf die Geschwindigkeit der Triazetinspaltung untersucht. Was die Konzentrationsfunktion der Gallensalze betrifft, so ist dieselbe von Loevenhart und Souder. von Donath[2]) und von Terroine untersucht worden. Letzterer Forscher kommt zu folgendem Resultat:

Für die Spaltung der Ester und Triglyzeride von niedrig-molekularen Säuren gibt es, wie auch Loevenhart zeigte, ein Konzentrationsoptimum der Gallensalze, und zwar unter den von Terroine gewählten Bedingungen bei 0,33 %.

Für den Fall der Hydrolyse von Triolein gibt es hingegen kein Optimum der Gallensalzkonzentration. Man beobachtet ein zuerst regelmässiges Zunehmen, das nach und nach abnimmt und dann aufhört, was Donath schon gezeigt hat.

Besondere Sorgfalt hat Terroine auf den Nachweis verwendet, dass die Gallensalze nicht, wie u. a. Bradley[3]) behauptet hat, nur emulgierend wirken. Ihre beschleunigende Wirkung zeigt sich nämlich am besten bei allen an sich schon löslichen Substraten, wie Estern und Triglyzeriden; sie wirken also auch in Fällen, wo die Löslichkeit und die Homogenität der zu spaltenden Mischungen gar nicht beeinflusst werden können.

Einfluss der Azidität.

Nach älteren Angaben von Grützner und von Gamgee soll die Extraktion des Enzyms durch wässeriges Glyzerin befördert werden, wenn dieses mit Soda schwach alkalisch gemacht ist.

Was den Einfluss der Azidität auf die Wirksamkeit des Enzyms betrifft, so liegen nach älteren Arbeiten von Nencki, Rachford und Fokin[4]), neuere Ergebnisse von E. Baur[5]) und von Terroine (l. c.) und mit der modernen Methodik angestellte von H. Davidsohn[6]) vor. Nach denselben liegt das Aziditätsoptimum der Pankreasesterase (Duodenalsaft vom Säugling, bestimmt an Tributyrin mit der stalagmometrischen Methode) bei $3{,}2 \cdot 10^{-9}$, also $p_H = 8{,}5$.

Davidsohn berechnet hiernach die Säuredissoziationskonstante der als Ampholyten aufgefassten Pankreasesterase $K_a = 1{,}0 \cdot 10^{-7}$.

[1]) v. Fürth u. Schütz, Hofm. Beitr. 9, 28; 1907.

[2]) Donath, Hofm. Beitr. 10, 390; 1908.

[3]) H. C. Bradley, Jl Biol. Chem. 6, 133; 1909.

[4]) Fokin, Revue der Fette und Harze 1904, 244.

[5]) E. Baur, Zs. angew. Chem. 22, 97; 1909. E. Baur hob wohl zuerst die ausschlaggebende Bedeutung der Azidität bzw. Alkalinität auf den Wirkungsgrad der Pankreaslipase scharf hervor.

[6]) Davidsohn, Biochem. Zs 45, 284; 1912 und 49, 249; 1913.

Einfluss der Temperatur.

Auch in dieser Hinsicht hat Terroine Versuche angestellt (l. c. S. 420 u. ff.). Nach diesem Autor verliert Pankreassaft, 10 Minuten lang auf 65° erwärmt, jede lipolytische Kraft. Versucht man aus den Zahlen Terroines die Inaktivierungskonstante (Bd. I, S. 176) zu berechnen, so gelangt man zu einem angenäherten Wert, $k_c = 1 \cdot 10^{-2}$. Ob diese Ergebnisse bei optimaler Azidität gewonnen sind, lässt sich schwer beurteilen. Jedenfalls scheint hiernach die Pankreasesterase bedeutend wärmeempfindlicher zu sein als z. B. Saccharase. Vergl. hierzu Bd. I, S. 182.

Terroine gibt ferner an, dass das Enzym gegen Erwärmung in Gegenwart von Gallensalzen noch empfindlicher ist als das davon freie Enzym, und zwar könnte man aus seinen Zahlen für das durch Gallensalze aktivierte Enzym die Konstante $k_c = 3 \cdot 10^{-8}$ bei 40° annehmen.

Über den Einfluss der Temperatur auf den Reaktionsverlauf siehe S. 25.

Einfluss von Neutralsalzen.

Dass zahlreiche Neutralsalze, besonders Chloride der Alkalien und alkalischen Erden, die hydrolytische Wirkung der Pankreaslipase erhöhen, geht aus den Versuchen von Pottevin[1]), Kanitz, Terroine (l. c.), Minami[2]), Pekelharing[3]) u. a. hervor.

Folgendes Beispiel, der zitierten Arbeit von Pekelharing entnommen, zeigt, dass es sich um ganz beträchtliche Aktivierungen handelt:

4 ccm Lipaselösung (nach Rosenheim) wurden mit Hilfe von wenig Natriumkarbonat in Wasser zu einem Volumen von 200 ccm gelöst und in 4 Portionen zu je 50 ccm geteilt; jede enthielt 1 ccm neutrales Olivenöl; zu drei davon wurden wechselnde Mengen NaCl bzw. äquiv. Mengen $CaCl_2$, $BaCl_2$ und $MgCl_2$ zugesetzt; alle Lösungen wurden auf die gleiche Alkalinität, schwach rosa Phenolphthaleinfärbung (schätzungsweise pH = 8), gebracht. Nach sechsstündiger Digestion wurden verbraucht:

Zusatz	ccm 0,25 n. NaOH	Zusatz	ccm 0,25 n. NaOH
—	0,8	—	0,6
2 g NaCl	2,4	100 mg $CaCl_2$	1,4
4 g NaCl	4,6	220 mg $BaCl_2$	1,3
6 g NaCl	4,4	185 mg $MgCl_2$	2,7

Falk[4]) betont den grossen Unterschied zwischen Salzen 1-wertiger und 2-wertiger Metalle ($CaCl_2$).

Die Fettsynthese wird durch diese Neutralsalze nicht beschleunigt, sondern sogar gehemmt, wie Pekelharing nachgewiesen hat. Nach Ansicht dieses Forschers besteht die Rolle der untersuchten Salze darin, dass dieselben Fettsäure als Seife ausscheiden und so aus dem System entfernen, wodurch die Spaltung weiter fortschreiten kann.

1) Pottevin, C. r. 136, 767; 1904.

2) Minami, Biochem. Zs 39, 392; 1912.

3) Pekelharing, H. 81, 355; 1912. — Siehe auch Versuche von Hamsik, H. 71, 238; 1911.

4) Falk, Jl Biol. Chem. 36, 229; 1918.

Bei höheren Konzentrationen geht die beschleunigende Wirkung der Neutralsalze in eine hemmende über. Der Höhepunkt der Beschleunigung entspricht einer für jedes Salz besonderen Konzentration, welche in der Reihe Chlorid, Bromid, Jodid, Fluorid stark abnimmt. (Terroine).

Auch die Gallensalze üben zweifellos eine Salzwirkung aus, welche sich über ihre Lipoid-Wirkung und ihre spezifische Wirkung superponiert; dies wäre in künftigen Untersuchungen zu berücksichtigen.

Aktivatoren und Paralysatoren.

Fluornatrium. Eine besonders starke Neutralsalzwirkung auf Pankreasesterase übt das Fluornatrium aus, wenn es auch vielleicht hinsichtlich seiner Wirkungsart keine Sonderstellung gegenüber den anderen Alkalisalzen einnimmt. Seine stark hemmende Wirkung ist von Loevenhart u. Peirce[1]) studiert worden, welche aber auch angeben, dass minimale Mengen von NaF beschleunigen. Die verzögernde Wirkung des Fluornatriums äussert sich auf niedrige Ester, wie Äthylazetat, viel stärker als auf die Glyzeride der höheren Fettsäuren[2]). Über die Grenzen dieser Wirkungen gehen die Angaben der genannten Forscher und diejenigen von Terroine und Minami auseinander. Sehr wesentlich ist hier der Befund von Davidsohn[3]), dass Pankreasesterase gegen NaF sehr viel empfindlicher ist als Magenesterase. Davidsohn konnte in den meisten Versuchen mit Pankreaslipase erst bei einer NaF-Konzentration von 1 : 80000, in einem Versuch erst bei 1 : 240000 ein Aufhören der Hemmung beobachten, während sich die Magenesterase etwa 50mal resistenter zeigte; an Magenlipase beobachtete Davidsohn bei Konzentrationen von 1 : 1600 bis 1 : 3200 keine Hemmung mehr.

Die gefundene Verschiedenheit der beiden Esterasen gegen NaF scheint nicht auf einem verschiedenen Gehalt an Ca-Salzen zu beruhen, sondern deutet, wie Davidsohn betont, auf die Existenz zweier verschiedener Enzyme hin, was ja auch durch die Ungleichheiten der optimalen Azidität und durch das verschiedene Verhalten gegen Gallensäuren wahrscheinlich gemacht wird.

Als anorganische Aktivatoren sind ausserdem auch die Mangansalze zu nennen (Magnus[4]).

Anorganische Gifte sind ausser NaF alle Oxydationsmittel, besonders Ozon[5]) und Permanganat, ferner $HgCl_2$ und Arsensäure.

Organische Aktivatoren und Paralysatoren. Die Wirkung der gallensauren Salze ist S. 16 bereits besprochen worden; vergl. auch S. 25.

---

[1]) Loevenhart u. Peirce, Jl Biol. Chem. 2, 397, 1907.
[2]) Amberg u. Loevenhart, Jl Biol. Chem. 4, 149; 1908.
[3]) Davidsohn, Biochem. Zs 45, 284; 1912.
[4]) Magnus, H. 48, 376; 1906.
[5]) Kastle, Publ. H. a. M. H. Hyg. Lab. Bull. 26. — Biochem. Zbt. 5, 1181; 1906.

Saponin aus Quillajarinde aktiviert nach Flohr[1]) in kleinen Mengen (Maximum 2%; ev. besteht eine Beziehung zur Oberflächenspannung).

Der von Rosenheim[2]) gefundene Aktivator ist noch nicht geklärt.

Nach Minami[3]) enthalten Blut, Leber und Muskel Aktivatoren für Pankreasesterase.

Glyzerin beschleunigt, und zwar besonders durch seine Einwirkung auf die Dispersion der Fette und Öle[4]).

Bemerkenswert ist, dass Chloroform, welches im allgemeinen Enzymwirkungen nicht stört, die Esterase inaktivieren soll.

Eine Reihe von Lipoiden hemmen, z. B. Cholesterin; der Einfluss von Lezithin ist noch nicht klargelegt[5]).

Trypsin vernichtet die Pankreasesterase[6]).

Die sehr interessante Tatsache, dass der Pankreassaft eine mit der fettspaltenden Wirkung parallelgehende hämolytische Wirkung ausübt (Friedemann[7]), Wohlgemuth[8]), Neuberg und Reicher[9])) wird im Anhang unter „Lezithase" besprochen.

Kinetik.

Die mit Esterasen angestellten Versuche beziehen sich in der Regel auf Systeme mit makroskopisch wahrnehmbaren Grenzflächen (Suspensionen), da die meisten Lipasen in Wasser unlöslich sind. Lipolytisch wirksame Glyzerinauszüge lassen sich nach A. Kanitz[10]) aus Schweinepankreasdrüsen gewinnen. Mit diesen hat Kanitz die Hydrolyse von Olivenöl und Rizinusöl verfolgt.

Je 10 ccm Olivenöl werden in Reagenzgläsern mit 3,9 ccm 0,10 norm. Natronlauge, 0,25 ccm 1 norm. $CaCl_2$ und 1 ccm Lipaseextrakt vermischt und der Inhalt je eines Reagenzglases wird nach der unter t verzeichneten Minutenzahl titriert. Die dabei verbrauchten Kubikzentimeter 0,10 norm. Natronlauge sind unter x angegeben.

t	x	$\frac{x}{t}$	$\frac{x}{\sqrt{t}}$
0	0,0	—	—
70	9,2	0,131	1,10
140	12,3	0,088	1,04
288	19,0	0,065	1,12
405	23,1	0,057	1,15
1455	34,2	0,023	0,90

[1]) Flohr, Ned. Tijdschr. Geneesk. 2, 1177; 1918.
[2]) Rosenheim, Jl of Physiol. 40, XIV; 1910.
[3]) Minami, Biochem. Zs 39, 392; 1912.
[4]) Kalaboukoff u. Terroine, C. r. 147, 712; 1908. — Terroine, Biochem. Zs 23, 404; 1910.
[5]) Küttner, H. 50, 472; 1907. Daselbst ältere Literatur. Ferner Terroine, Soc. Biol. 68, 439, 518, 666, 754; 1910.
[6]) Terroine, Soc. Biol. 65, 329; 1908.
[7]) Friedemann, Dtsch. med. Woch. 33, 585; 1907.
[8]) Wohlgemuth, Biochem. Zs 4, 271; 1907.
[9]) Neuberg u. Reicher, Biochem. Zs 4, 281; 1907. — 11, 400; 1908.
[10]) Kanitz, H. 46, 482; 1905.

Auch Engel[1]) hat z. T. mit Lösungen gearbeitet, und zwar mit Glyzerinauszügen von Pankreatin „absolut“, Rhenania, wobei 6 g Pankreatin 24 Stunden lang mit 250 ccm Glyzerin digeriert wurden, z. T. auch, wie in folgendem Versuch, mit eingewogenem festem Pankreatinpräparat (heterogenes System). Er kommt in seiner sorgfältigen Untersuchung mit der gleichen Methodik wie Volhard und Stade (vergl. S. 10 u. ff.) an Eigelb-Emulsion zum Resultat, dass die Schützsche Regel bei der enzymatischen Fettverseifung gilt, dass also bei gleicher Verdauungszeit die Verdauungsprodukte sich verhalten wie die Quadratwurzeln aus den Enzymmengen, und dass bei gleichen Fermentmengen die Verdauungsprodukte sich verhalten wie die Quadratwurzeln aus den Verdauungszeiten. Für ein und denselben Saft muss demnach gelten:

$$x = k\sqrt{Et}.$$

Dies ist bei Engels Versuchen auch der Fall.

	4 Stunden			9 Stunden			25 Stunden			
Pankreatin	x beob.	x ber.	$\frac{x}{\sqrt{Et}}$	x beob.	x ber.	$\frac{x}{\sqrt{Et}}$	x beob.	x ber.	$\frac{x}{\sqrt{Et}}$	
0,04 g	17,6	16,8	4,4	18,4	24,5	3,1	35,0	38,3	3,5	Temp. 41°.
0,09 g	20,9	24,5	3,5	36,3	35,0	4,0	58,2	53,0	3,8	
0,16 g	35,2	31,6	4,4	48,4	44,6	4,0	72,1	65,0	3,6	

Die Berechnung der Werte $x_{ber.}$ ist nach der Arrheniusschen Formel (28) (Bd. I, S. 126) mit der Konstanten $\varkappa = 1{,}0$ ausgeführt worden. Die Abweichungen sind, wie man sieht, nicht unerheblich.

Schon vor Kanitz und Engel haben Kastle und seine Mitarbeiter[2]) die Esterasespaltung niederer Ester kinetisch untersucht; zur Verwendung kamen trübe, durch Tuch filtrierte, wässerige Extrakte von Schweinepankreas.

Röhrchen, welche 4 ccm Wasser, 0,26 ccm Äthylbutyrat und 0,1 ccm Toluol enthielten, wurden während 5 Minuten auf 40° erwärmt. Dann wurde 1 ccm eines 10%igen Extraktes hinzugefügt; nach bestimmten Zeiten wurde mit 0,05 n. KOH titriert. P = E = Enzymmenge.

Minuten	x	$k \cdot 10^4$	$\varkappa \cdot P$
5	(6,53)	135	(0,45)
10	(8,66)	91	(0,40)
15	8,58	60	0,26
20	9,54	50	0,24
25	10,67	50	0,24
30	(9,41)	38	(0,16)
60	17,82	32	0,28
120	25,35	24	0,32
180	28,36	18	0,28

Die nach dem Reaktionsgesetz 1. Ordnung berechnete Konstante k sinkt stark und stetig. Eine Interpolation zeigt übrigens, dass die Beobachtungs-

[1]) Engel, Hofm. Beitr. 7, 77; 1905.

[2]) Kastle u. Loevenhart, Amer. Chem. Jl 24, 491; 1900. — Kastle, Johnston u. Elvove, ebenda 31, 521; 1904.

fehler, vermutlich wegen der Schwierigkeit, so kleine Estervolumen genau zu pipettieren, sehr gross waren.

Die Geschwindigkeit der Esterspaltung fanden die Autoren angenähert proportional der Enzymkonzentration.

Mit einiger Annäherung schliessen sich die obigen Versuchszahlen der Schützschen Regel, $x = k\sqrt{t}$ an (Bd. I, S. 124). In der letzten Spalte finden sich die Werte $\varkappa P$, die ich früher nach Formel (28) $\varkappa Pt = a \ln (a)/(a-x) - x$ berechnet habe (Bd. I, S. 126). Dass diese Werte einigermassen konstant sind, dürfte nicht von grösserer Bedeutung sein. Die Formel (28) ist unter der Annahme abgeleitet, dass die Konzentration des freien Enzyms der Konzentration der Reaktionsprodukte umgekehrt proportional ist. Die gleiche Formel ergibt sich unter der, wenigstens in diesem Fall wahrscheinlichsten Annahme, dass nicht die Konzentration, sondern die Wirksamkeit des Enzyms umgekehrt proportional mit den Reaktionsprodukten ist, von welchen in erster Linie die Säure in Betracht kommt.

Wie Kastle und Loevenhart gefunden haben und seither mehrfach bestätigt wurde, ist nämlich die Pankreaslipase stark säureempfindlich (optimales pH = 8). Es würde sich wohl lohnen, zu untersuchen, ob nicht die Formel für monomolekulare Reaktionen recht angenähert gilt, wenn von vornherein durch Zusatz eines geeigneten Puffers die optimale Azidität konstant gehalten wird.

Die Arbeit von Kastle und Loevenhart ist auch deswegen bemerkenswert, weil in derselben der enzymatischen Synthese der Ester Aufmerksamkeit gewidmet worden ist.

Nachdem auch Pottevin[1]) die enzymatische Bildung von Mono- und Triolein beobachtet und studiert hatte — eine seiner Versuchsreihen ist bereits in Bd. I, S. 215 mitgeteilt worden — hat Dietz das Problem einer eingehenden quantitativen Bearbeitung unterworfen.

Dietz[2]) hat ein heterogenes System studiert; Pankreasesterase wurde in Form geschabter Gewebefasern von der Pankreasdrüse des Schweines in Amylalkohol emulgiert, welcher Wasser und Buttersäure bzw. Amylbutyrat gelöst enthielt.

Man erwartet zunächst die Geschwindigkeitsgleichung:

$$\frac{dx}{dt} = k_1\, C_{\text{Säure}} \cdot C_{\text{Alkohol}} - k_2\, C_{\text{Ester}} \cdot C_{\text{Wasser}},$$

wobei sich alle Konzentrationen auf die „Enzymphase“ beziehen. Die Konzentration von Wasser und Alkohol ist annähernd konstant, da durch die Vorgänge stets nur kleine Mengen verschwinden. Andererseits sollen sich die Stoffe zwischen Enzym und Flüssigkeit nach dem Nernstschen Verteilungssatz verteilen, d. h. $C_{\text{Enzym}} = \alpha \cdot C_{\text{Lösung}}$. Die Proportionalitätsfaktoren, wie die konstanten Konzentrationen von Alkohol und Wasser, gehen in die Kon-

[1]) Pottevin, C. r. 136, 1152; 1903 u. 137, 378; 1904. — Ann. Inst. Pasteur, 20, 901; 1906.

[2]) Dietz, H. 52, 279; 1907. Siehe auch Bodenstein u. Dietz, Zs f. Elektroch. 12 605; 1906.

stanten ein, und man erhält daher:

$$\frac{dx}{dt} = k_1 C_{Säure} - k_2 C_{Ester} = k_1 (a - x) - k_2 x.$$

Löst man nur wenig Wasser in Amylalkohol, so wird die Gegenreaktion sehr klein, und der Vorgang verläuft einfach nach:

$$\frac{dx}{dt} = k (a - x)$$

wie folgende Tabelle erkennen lässt:

a = 0,10 normal

3,5 % H_2O			5,01 % H_2O		
t Stunden	Millimol Säure pro Liter	$k \cdot 10^4$	t Stunden	Millimol Säure pro Liter	$k \cdot 10^4$
0,00	100,00	—	0,00	100,00	—
2,50	97,06	64	2,00	94,12	130
9,57	87,10	62	5,53	87,82	100
14,35	80,84	64	10,83	76,38	120
24,45	69,74	63	15,17	67,54	120
31,88	62,38	63	25,20	52,04	120
47,89	48,32	65	32,58	48,18	120
55,27	43,56	64	48,83	31,38	120
76,67	33,94	60	55,92	28,80	110
100,42	23,98	62	77,73	22,16	100
384	8,12	63	385	10,96	120

Geht man zu höheren Wassergehalten über, so stellt sich ein von beiden Seiten erreichbarer Endzustand ein, und es wird die Geschwindigkeit der beiden entgegengesetzten Reaktionen messbar. Einen solchen Fall gibt die folgende Tabelle wieder.

6,5 % H_2O. — 5,01 g Enzym

Esterbildung			Esterspaltung		
t Stunden	Millimol Säure pro Liter	$k_1 \cdot 10^4$	t Stunden	Millimol Säure pro Liter	$k_2 \cdot 10^4$
0,00	100,00	—	0,00	0,00	—
3,90	93,74	72	6,67	2,50	18
10,52	80,83	90	19,73	6,50	18
13,75	77,50	89	32,65	8,08	15
23,32	65,00	84	68,10	12,50	15
29,25	59,17	83	94,30	13,08	16
36,20	53,33	82	142,31	14,00	
47,97	45,00	81	215,50	15,00	
71,68	33,34	81	∞	16,25	
97,57	27,08	76			
∞	16,25	82			

Nach dem Massenwirkungsgesetz soll gelten (vergl. Bd. I, Kap. 7, S. 208 u. ff.; wie daselbst S. 210 erwähnt, bezeichnet Bodenstein mit K den reziproken Wert)

$$\text{Gleichgewichtskonstante } K = \frac{C_{Ester}}{C_{Säure}} = \frac{k_1}{k_2}.$$

Dies war zwar bei obigem Versuch der Fall; es wurde nämlich gefunden:

$$K = \frac{C_{Ester}}{C_{Säure}} = 5{,}2 \quad \text{und} \quad \frac{k_1}{k_2} = \frac{82}{16} = 5{,}1.$$

Indessen zeigen die verschiedenen Versuchsreihen von Dietz, besonders diejenigen mit 8% Wasser, durchaus keine Übereinstimmung; die Gleichgewichtskonstanten K bzw. k_1/k_2 nehmen ganz verschiedene Werte an, wie z. B. der Vergleich des folgenden Versuchs mit dem obigen zeigt:

8% H_2O. — 5,01 g Enzym

Esterbildung t Stunden	Millimol Säure pro Liter	$k_1 \cdot 10^4$	Esterhydrolyse t Stunden	Millimol Säure pro Liter	$k_2 \cdot 10^4$
0,00	100,00	—	0,00	0,00	—
1,98	94,04	140	3,63	5,60	75
4,00	88,22	140	7,60	10,82	77
6,98	80,60	140	16,77	17,54	64
11,55	67,90	160	24,05	22,02	70
14,98	62,69	160	89,30	31,34	
25,10	48,88	160	∞	31,42	
96,95	31,72				
∞	31,42				
		Mittel 150			Mittel 72

Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge, welche schon Kastle und Loevenhart gefunden hatten, zeigte sich auch hier, und zwar sowohl hinsichtlich der Spaltungs- als der Bildungsgeschwindigkeit des Esters:

Wassergehalt	Enzymmenge	Konstanten × 10⁴ k_1	k_2
8%	5,01 g	150	72
	10,02 g	280	140

Dieser Befund steht auch in Übereinstimmung mit dem von Pottevin (l. c. Bd. I).

Bemerkenswert ist, dass nach den Angaben von Dietz der Gleichgewichtszustand im homogenen System und bei Anwendung einer Säure als Katalysator einen ganz anderen Betrag erreicht, als bei Verwendung des Enzyms. Berechnet man die Gleichgewichtskonstante nach der Formel

$$K = \frac{[\text{Ester}]\,[\text{Wasser}]}{[\text{Säure}]\,[\text{Alkohol}]}$$

und setzt für die molare Konzentration des Wassers 4,44 und für Alkohol 8,2 (Zahlen die für 8% Wassergehalt gelten), so erhält man für das homogene System K = 3,2, während die Enzymversuche ergaben:

Anfangskonzentration	= 0,05 n	0,10 n	0,20 n
K	= 0,70	1,2	1,8

Eine erneute Durcharbeitung dieser Verhältnisse unter genauer Berücksichtigung der Azidität und der Menge mitwirkender Aktivatoren (Co-Enzyme) erscheint erforderlich.

Besonders zu berücksichtigen ist bei weiteren Versuchen der Befund von Terroine[1]), dass Gallensalze nicht nur die Reaktionsgeschwindigkeit, sondern auch das Gleichgewicht im Endzustand ändern. Es ist zu schliessen, dass die aktive Masse wenigstens einer Reaktionskomponente (Ester bzw. Säure) durch den Zusatz der Gallensalze geändert wird. Unter den quantitativen Ergebnissen Terroines sei noch hervorgehoben, dass die Wirkungsweise der Gallensalze stets dieselbe ist, welches auch der zu spaltende Körper sei. Für die Spaltung der Ester und Triglyzeride niederer Säuren stellte Terroine ein Konzentrationsoptimum der Gallensalze fest.

Auch Synthesen der höheren Fettsäuren durch Pankreasesterase (Pulver) sind durchgeführt worden, und zwar des Amylesters der Stearinsäure von Pottevin, des Glyzerinesters der Palmitin- und Stearinsäure von Hamsik[2]).

Einfluss der Temperatur auf die Kinetik.

Nach den Untersuchungen von Kastle und Loevenhart (l. c.) an Äthylbutyrat hat die enzymatische Spaltung dieses Esters einen recht kleinen Temperaturkoeffizienten (vergl. Bd. I, S. 192); zwischen 20° und 30° beträgt der Quotient $k_{t+10} : k_t$ rund 1,3; die Konstante A ist rund 5000. Nach Terroine soll der Temperaturkoeffizient der Hydrolyse ein wenig von der Natur des Substrates abhängig sein. Aus Terroines Zahlen für Äthylbutyrat findet man $k_{t+10} : k_t$ zu etwa 1,9 (zwischen 15° und 25°) und A rund 11000. Es wird eine „optimale Wirkungstemperatur" von etwa 40° angegeben.

Der Temperatureinfluss auf das Enzym selbst und auf die Reaktion ist offenbar bei wechselnder Azidität untersucht worden. Auf die Temperaturkurven, deren Koordinatenbezeichnung unvollständig ist, sei hier nur verwiesen (l. c. S. 422 u. 423). Bei 54° soll die Hydrolyse „fast Null sein".

Hinsichtlich der Wärmeempfindlichkeit des Enzyms selbst kommt Terroine (Biochem. Zs 23) zu den auf S. 18 angegebenen Resultaten.

Einwirkung der Kinase.

Wenn man durch Zugabe von Kinase Pankreassaft proteolytisch aktiv macht, tritt eine rasche Abnahme des lipolytischen Vermögens ein. Diese bleibt aber aus, wenn der Pankreassaft, wie im Darm, auf fremdes Eiweiss einwirkt.

Messung kleiner Enzymmengen durch Duodenalsondierung siehe S. 44.

---

[1]) Terroine, Biochem. Zs 23, 404; 1910.
[2]) Hamsik, H. 71, 238; 1911. — 90, 489; 1914.

Technische Anwendung.

In der Gerberei wird nunmehr an Stelle von Kot verschiedener Tiere, dessen Enzymgehalt früher zur Bearbeitung feinerer Ledersorten ausgenützt wurde, vielfach die lipolytische Wirkung von Pankreaspräparaten verwendet.

So soll die Beize Oropon der Firma Röhm & Haas eine intensive fettspaltende Wirkung (Röhm D.R.P. 200519, 203889, 217934, kl. 28a. Gr. 2) besitzen.

3. Darmesterase.

Enzymmaterial. Auch hier kommt in erster Linie der sezernierte Saft in Betracht, wie ihn Boldyreff[1]) erhalten hat.

In zweiter Linie läst sich die Lipase der Darmschleimhaut verwenden[2]), welche aus dieser extrahiert werden kann.

Auch im Darminhalt (Meconium) menschlicher und tierischer Föten finden sich Enzyme, welche sowohl Ester als Lezithin spalten (Pottevin, Ibrahim, Porcher und Tapernoux).

Verhalten. Im allgemeinen scheint die Darmesterase der Pankreasesterase ganz nahe zu stehen. Soweit es sich um Duodenalsaft handelt, ist überhaupt eine Scheidung hinsichtlich des Ursprunges schwierig.

Nach Kalaboukoff und Terroine (l. c.) wird Darmesterase durch Gallenstoffe weniger energisch aktiviert als Pankreasesterase; dies kann aber darauf beruhen, dass die untersuchte Darmesterase schon von vornherein eine gewisse Menge Aktivator erhalten hat.

Über eventuelle Lokalisation im Darm siehe Frouin[3]), Camus und Nicloux[4]).

K. G. Falk[5]) nimmt auf Grund eigener Versuche zwei Esterasen im menschlichen Duodenum an. Die eine, welche in der Regel nach Aufnahme von Nahrung gefunden wurde, erwies sich aktiver gegen Triazetin als gegen Äthylbutyrat. Die andere, die anwesend war, wenn keine Nahrung aufgenommen wurde, soll umgekehrt gegen Äthylbutyrat wirksamer sein als gegen Triazetin.

Neutralsalze üben in 1 n.-Lösungen auf beide Enzyme ausgesprochene Hemmungen aus, die in folgender Reihenfolge steigen: Chloride, Bromide, Fluoride, Jodide.

Methyl- und Äthyl-Alkohol sollen schon in 0,1 mol. Lösung hemmen.

4. Esterasen der Gewebe.

Esterspaltung wurde in den Extrakten der meisten daraufhin untersuchten Gewebe nachgewiesen (Loevenhart[6]), Pagenstecher[7]), Winternitz

[1]) Boldyreff, H. 50, 394; 1907.
[2]) Umber u. Brugsch, Arch. f. exp. Pathol. 55, 164; 1906. — Rona, Biochem. Zs 23, 482; 1911.
[3]) Frouin, Soc. Biol. 61, 665; 1906.
[4]) Camus u. Nicloux, Soc. Biol. 68, 619; 1910.
[5]) Falk, Jl. Amer. Chem. Soc. 36, 1047; 1914.
[6] Loevenhart, Amer. Jl Physiol. 6, 331; 1902.
[7]) Pagenstecher, Biochem. Zs 18, 285; 1908.

und Meloy[1]), Juschtschenko[2]), Rona[3]), Freudenberg[4]), Porter[5]), Bach[6])). Die davon abweichenden Resultate von Saxl[7]) sind nicht bestätigt worden.

Abgesehen von Pankreas ist stets die Leber am reichsten an Esterase gefunden worden, dann folgen Milz, Lunge, Fett usw. in einer Reihenfolge, die bei verschiedenen Tierarten offenbar wechselt.

a) Leber.

Leberesterase ist zuerst eingehend von Kastle[8]) und Loevenhart[9]) und ihren Mitarbeitern, ferner von Ramond[10]) untersucht worden.

Enzymmaterial. Die zerkleinerte Leber wird von Kastle[9]) und Loevenhart mit angesäuertem Wasser extrahiert und das Extrakt filtriert, wobei allerdings ein nicht unerheblicher Teil der Enzymwirkung verloren geht.

Auch mittels Glyzerin lässt sich Leberesterase geeignet extrahieren; wie andere Enzyme, so soll auch diese Esterase in Glyzerin jahrelang haltbar sein. (Simonds[11])).

Dakin[12]) zerreibt Schweineleber mit Kieselgur und Sand und zentrifugiert zur Reinigung den durch hydraulisches Auspressen gewonnenen Saft, der auf Eis mehrere Wochen haltbar ist.

Ähnlich arbeitet Peirce[13]); 100 g Schweineleber, mit Sand und Wasser vermahlen und durch ein Tuch getrieben, werden mit destilliertem Wasser auf ein Liter verdünnt. Die mit Toluol versetzte Flüssigkeit steht einen Tag bei 37°, dann mehrere Wochen bei Zimmertemperatur und wird dann filtriert.

Reinigung des Präparates. Die obige Enzymlösung wurde von Peirce 5—6 Tage in Kollodiumsäcken dialysiert und filtriert. Dabei verlor die Lösung 90% ihrer Trockensubstanz und gleichzeitig etwa 20% ihrer Aktivität, so dass die Reinigung beträchtlich war. Die so bereitete Lösung wurde nun mit Ammoniumsulfat halbgesättigt, worauf bis zur Klarheit filtriert wurde; der Niederschlag war inaktiv und wurde verworfen. Das Filtrat wurde nun mit Ammoniumsulfat ganz gesättigt. Nach Filtration erwies sich nun das Filtrat inaktiv. Der Niederschlag wurde in Wasser aufgenommen

1) Winternitz u. Meloy, Jl Med. Research 22, 107; 1910.
2) Juschtschenko, Biochem. Zs 25, 49; 1910: Über fettsp. Enzyme der Schilddrüse.
3) Rona, Biochem. Zs 32, 482; 1911.
4) Freudenberg, Biochem. Zs 45, 467; 1912.
5) A. E. Porter, Biochem. Jl. 10, 523; 1916.
6) A. Bach, Fermentf. 1, 151; 1916.
7) Saxl, Biochem. Zs 12, 343; 1908.
8) Kastle, Johnston u. Elvove, Amer. Chem. Jl 31, 521; 1903.
9) Kastle u. Loevenhart, Amer. Chem. Jl 24, 491; 1900. — Loevenhart, Jl Biol. Chem. 2, 597; 1906.
10) Ramond, Soc. Biol. 57, 342 u. 462; 1904. — Siehe auch Sieber, H. 55, 177; 1903.
11) Simonds, Amer. Jl Physiol. 48, 141; 1919.
12) Dakin, Jl of Physiol. 32, 199; 1904.
13) Peirce, Jl Biol. Chem. 16, 1; 1913.

und die Lösung dialysiert, bis keine Trübung mit $BaCl_2$ mehr eintrat. Diese hochgereinigte Lösung enthielt in 15 ccm 4,8 mg Trockensubstanz. 20 ccm dieser Lösung in einem Totalvolumen von 560 ccm hydrolysierten 650 mg Äthylbutyrat in 28,1 Minuten (Endazidität: 10 ccm 0,05 n.-Säure in 50 ccm Reaktionsmischung).

Herstellung der Enzymlösungen nach Rona: Siehe Biochem. Zs 32.

Leberesterasen sind hauptsächlich an Estern niederer Fettsäuren untersucht worden; gegen natürliche Fette sind sie jedenfalls weniger wirksam als die Magenlipase und pflanzliche Lipasen; einen diesbezüglichen Vergleich an verschiedenen Substraten findet man bei H. E. Armstrong und Ormerod[1]).

Leberbrei spaltet auch Amylsalizylat (Magnus; Loevenhart, Jl Biol. Chem. 2).

Optimale Azidität. In dieser Hinsicht scheint die Esterase der Leber der Pankreasesterase nahezustehen, mit einem pH-Optimum zwischen 7 und 8.

Aktivatoren und Paralysatoren. An Leberesterase hat Kastle[2]) die Wirkung von zahlreichen anorganischen Stoffen in äquivalenten Mengen untersucht.

Starke Giftwirkung wurde gefunden bei: Ozon, Chlor, Brom, Natriumfluorid, Succinylperoxyd, Jodcyan, Kaliumpermanganat.

Deutliche, aber schwächer hemmende Wirkung üben aus: Sublimat, Chromsäure, Kupfersulfat und Perosmiumsäure.

Nahezu ungiftig sind nach Kastles Befund: Silbernitrat, Jodwasserstoffsäure, Formaldehyd, Trikresol, Blausäure, Kaliumnitrit und Bernsteinsäure. Ferner Toluol und Chloroform.

Temperatureinfluss. (Vergl. Bd. I, S. 191.) Kastle und Loevenhart und später Kastle, Johnston und Elvove haben den Temperaturkoeffizienten der Äthylbutyratspaltung gemessen. Für die angegebenen Temperaturen ergaben sich die untenstehenden Geschwindigkeiten und die daraus berechneten Quotienten $k_{t+10} : k_t$:

Temp.	— 10°		0°		10°		20°		30°		40°
v	0,70		2,26		3,89		5,27		6,96		(11,29)
$k_{t+10} : k_t$		3,23		1,72		1,36		1,10		1,89(?)	

Eine so starke Abnahme des Quotienten $k_{t+10} : k_t$ fanden später Kastle, Johnston und Elvove (l. c.) nicht; sie geben folgende Zahlen an:

Temp.	0°		10°		20°		30°		40°
$k \cdot 10^4$	7,1		12,6		21,8		37,4		58,1
$k_{t+10} : k_t$		1,77		1,73		1,71		1,55	

Berechnet man aus diesen Zahlen den Koeffizienten A der Temperaturformel (29) Bd. I, S. 172, so ergibt sich ein Mittelwert von rund A = 9000.

[1]) H. E. Armstrong u. Ormerod, Proc. Roy. Soc. B 78, 376; 1906.
[2]) Kastle, Hyg. Labor. Treas. Dep. Bull. Nr. 26; 1906.

Kinetik.

Auch hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes der Esterspaltung verdankt man die ersten Versuche Kastle und Loevenhart (1900), weitere Messungen Kastle, Johnston und Elvove.

Wie bei den Versuchen mit Pankreasesterase schliessen sich die erhaltenen Spaltungswerte der Formel für monomolekulare Reaktionen nicht gut an; die Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung fallen nämlich mit fortschreitender Reaktion; nach Auffassung der genannten Autoren rührt dies davon her, dass die entstehende Säure hemmend wirkt; die von der Säure nicht gestörte Reaktion betrachtet Kastle als monomolekular (tatsächlich wären entsprechende Messungen mit konstant gehaltenem pH erwünscht). In folgendem Beispiel (Temp. 21°) ist der Abfall von k, abgesehen vom 1. Wert, verhältnismässig gering:

Minuten	30	60	64	97	121	132	198	204	361	467
x in ccm	(0,95)	1,30	1,45	1,80	2,05	2,25	2,75	2,90	3,50	3,80
$k \cdot 10^4$	(75)	54	57,5	50	47	49	44	47	38	35

Bei Variation der Esterkonzentration ist aber der Reaktionskoeffizient k nicht, wie es bei monomolekularen Reaktionen sein sollte, von der Substratkonzentration unabhängig, sondern wurde um so kleiner gefunden, je grösser die Esterkonzentration a war. Wie bei vielen anderen Enzymkonzentrationen erwies sich hier $k \cdot a$ annähernd konstant.

Hier ist auch eine Dissertation von A. Schmidt[1]) zu erwähnen, in welcher die Spaltung der Methyl- und Äthylester der Morphinglykolsäure durch den Lebersaft des Kaninchens studiert wurde. Der zeitliche Verlauf der Spaltung soll der Formel folgen:

$$k = \frac{1}{t\sqrt{E}} \ln \frac{a}{a-x},$$

wo E die Enzymkonzentration bedeutet.

Schliesslich hat Peirce[2]) eine gute dynamische Untersuchung der Äthylbutyrathydrolyse durch Schweineleberesterase ausgeführt. Auch er stellt fest, dass die Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung im allgemeinen abnehmen und erkennt die Bedeutung der Azidität für den Verlauf der Reaktion. „In einer Lösung vom gegebenen Volumen und gegebener Azidität ist die zur Hydrolyse einer bestimmten Menge Äthylbutyrats erforderliche Zeit umgekehrt proportional der Enzymkonzentration. Unter gleichen Aziditätsbedingungen hydrolysiert jedes Enzymteilchen dieselbe absolute Estermenge per Zeiteinheit, unabhängig von der Konzentration des Enzyms.“

„Bei einer gegebenen Enzymkonzentration ist die zur Hydrolyse einer gegebenen Estermenge erforderliche Zeit abhängig von der Säurekonzentration

[1]) A. Schmidt, Über eine Entgiftung durch Abspaltung der Methyl- und Äthylgruppe im Organismus. Dissert. Heidelberg 1901.

[2]) Peirce, Jl Amer. Chem. Soc. 32, 1517; 1910.

aber unabhängig von der Esterkonzentration, falls diese grösser als 0,005 n. ist. Bei jeder Azidität hydrolysiert also eine gegebene Enzymmenge innerhalb eines weiten Bereichs der Esterkonzentration sehr nahe die gleiche Menge Äthylbutyrat."

Peirce versucht diese Tatsache mit dem Massenwirkungsgesetz durch die Annahme in Übereinstimmung zu bringen, dass Enzym und Ester zu einer Zwischenverbindung zusammentreten, welche bei Esterkonzentrationen über 0,005 n. den grössten Teil des Enzyms enthält.

Siehe hierzu die Berechnungen von Michaelis und von van Slyke und Cullen, Bd. I, S. 108 u. ff.

Synthese. Wie mit Pankreas hat Hamsik[1]) auch mit Rindsleber Esterbildung (Aziditätsverminderung) beobachtet.

Asymmetrische Wirkungen. Mit Esterase aus Schweineleber hat Dakin[2]) seine interessanten asymmetrischen Spaltungen der Mandelsäure ausgeführt (Bd. I, S. 256).

b) Fettgewebe.

Extrahiert man frisches Schweinefett mit dem gleichen Gewicht Wasser bei 40° 1 Stunde lang und filtriert den auf 35° abgekühlten Auszug, so erhält man eine klare Lösung, welche Äthylbutyrat kräftig spaltet. Folgende Tabelle bezieht sich auf eine Messung des Verf.[3]), mit bei 17° ges. Äthylbutyratlösung bei 35°.

Minuten	ccm Barytlös.	a — x	$k \cdot 10^4$
0	0	2,70	—
2	0,3	2,40	256
6	0,75	1,95	235
9	1,05	1,65	237
16	1,65	1,05	250

Die, wie ersichtlich, schnelle Spaltung verläuft als Reaktion 1. Ordnung.

Freudenberg[4]) fand im Fettgewebe eines frischgetöteten Hundes und im Fett eines hungernden Kaninchens nur sehr geringe Fettspaltung (weniger als 1 % des Gesamtfettes pro Tag).

c) Verschiedene Organe.

In Milz[5])[6])[7]), Lungen[6])[8]), Nieren[6])[9]) sowie in Thyreoidea[10]), Plazenta[11]) und in Muskeln[6]), peripheren Nerven[12]), meist qualitativ, nachgewiesen.

[1]) Hamsik, H. 90, 489; 1914.

[2]) Dakin, Jl of Physiol. 30, 253; 1903 und 12, 199; 1905.

[3]) Euler, Hofm. Beitr. 7, 1; 1905. — Im Fettgewebe von Hühnern haben Pennington u. Hepburn (1911) eine Esterase gefunden.

[4]) Freudenberg, Biochem. Zs 45, 467; 1912.

[5]) Pagenstecher, Biochem. Zs 18, 285; 1908.

[6]) Rona, Biochem. Zs 32, 482; 1911.

[7]) Tanaka, Biochem. Zs 37, 249; 1911.

[8]) Sieber, H. 55, 177; 1908. — Saxl, Biochem. Zs 12, 343; 1908. — Sieber u. Dzierzgowski, H. 62, 263; 1909.

[9]) Battesti u. Baraja, Soc. Biol. 55, 820; 1903.

[10]) Juschtschenko, Biochem. Zs 25, 49; 1910. [11]) Savaré, Hofm. Beitr. 9, 141 1908.

[12]) Ukai, Tohoku, Jl of Exper. Medic. 1, 519; 1920.

5. Esterasen der Körperflüssigkeiten.

a) Blut.

Vorkommen. Ein esterspaltendes Enzym ist im Blut von Hanriot[1]) entdeckt worden; die Wirkung wurde zunächst am Monobutyrin geprüft. Indessen ist nach dem Befund von Rona und Michaelis[2]) Blut auch imstande, Tributyrin zu zerlegen, so dass sich die Annahme von Doyon und Morel[3]) und von Arthus[4]) von der Existenz einer besonderen Monobutyrinase im Blut wohl nicht mehr aufrecht erhalten lässt.

Über die physiologische Rolle der Blutesterase herrscht noch keine Klarheit; möglicherweise stammen die Blutesterasen ganz oder teilweise aus Organen und Geweben[5]); vermutlich ist die Leber an der Fettregulation des Blutes beteiligt. Bemerkenswert ist, dass die lipolytische Fähigkeit des Blutes ansteigt, wenn nach Hungertagen grosse Fettmengen (Rüböl, Talg) verfüttert werden (Abderhalden und Rona[6])). Der Gehalt des Blutes an Fett zeigt übrigens im Hungerzustande keine wesentliche Änderung (E. Freudenberg[7])).

Über die Bedeutung der Blutlipasen für den Fettstoffwechsel der Zellen siehe auch G. Bayer, Zs Biol. 69, 365; 1919.

Die Änderungen des fettspaltenden Vermögens des Blutes bei verschiedenen Krankheiten ist oft untersucht worden. Eine weitere Verfolgung verdient die Frage, ob eine Beziehung zwischen der Verteilung der Esterasen im Körper und seiner Widerstandsfähigkeit gegen Tuberkulose besteht (Winternitz u. Meloy, Jl Med. Res. 107; 1910. — Achard u. Clerc, Soc. Biol. 54, 1144; 1902 und 56, 812; 1904. — A. E. Porter, Biochem. Jl 10, 523; 1916).

Die Esterase des Blutes ist irgendwie mit den Erythrozyten verknüpft, da Doyon und Morel[8]), sowie Rona und Michaelis[2]) im Serum die enzymatische Wirkung im allgemeinen bedeutend schwächer fanden als im Blut. Nur bei Meerschweinchen und Kaninchen ist Blut und Serum gleich, und zwar sehr stark, wirksam.

Optimale Azidität. Nach Rona[9]) liegt das Optimum der Wirksamkeit der Serumlipase zwischen $pH = 7$ und 8,6. Die Figur 3 ist der Arbeit von Rona und Bien[10]) entnommen.

---

1) Hanriot, C. r. 123, 753, 833; 1896 und 124, 778; 1897. — Soc. Biol. 48, 925; 1896. Hanriot u. Camus, C. r. 124, 235; 1897.

2) Rona u. Michaelis, Biochem. Zs 31, 345; 1911.

3) Doyon u. Morel, Soc. Biol. 55, 682; 1903.

4) Arthus, Jl de Physiol. Pathol. 4, 455; 1902.

5) Weder Pankreas noch Schilddrüse dürfte die Hauptquelle der Blutlipase bilden; siehe v. Hess, Jl Biol. Chem. 10, 381; 1911.

6) Abderhalden u. Rona, H. 75, 30; 1911. — Abderhalden u. Lampé, H. 78, 396; 1912. — Busquet u. Vischniac konnten im intravaskulären Blut keine Fettspaltung nachweisen (Soc. Biol. 83, 844; 1920).

7) Freudenberg, Biochem. Zs 45, 467; 1912.

8) Doyon u. Morel, Soc. Biol. 58, 616; 1905.

9) Rona, Biochem. Zs 33, 413; 1911.

10) Rona u. Bien, Biochem. Zs 59, 100; 1914 u. 64, 13; 1914.

Kinetik. Rona und Ebsen[1]) fanden die Reaktionskonstanten 1. Ordnung für die Tributyrinspaltung (gemessen nach der Methode von Rona und Michaelis, S. 45) nicht unabhängig von der Anfangsmenge des Tributyrins, sondern ihr umgekehrt proportional. Die Geschwindigkeit der Esterspaltung war direkt proportional der Enzymmenge. Der zeitliche Verlauf der Spaltung war mit Monobutyrin als Substrat ein anderer als mit Tributyrin, was kaum auffallen kann, da in letzterem Falle eine stufenweise Reaktion vorliegt.

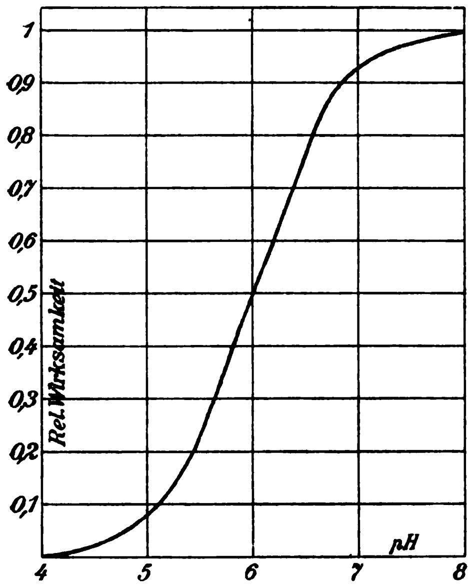


Fig. 3.
Wirkungskurve der Serumlipase nach Rona u. Bien.

Temperatureinfluss. Den Temperaturkoeffizienten der Esterspaltung durch Serumesterase hat Hanriot[2]) mit demjenigen der Pankreasesterase verglichen; er hat daraus Schlüsse auf die Verschiedenheit beider Enzyme gezogen, die nicht mehr als einwandfrei gelten können.

Über Lezithin-Spaltung im Blut siehe S. 47.

Paralysatoren. Über die Wirkung des Ätoxyls (Na-Salz der p-Aminophenyl-arsinsäure, $H_2N \cdot C_6H_4 \cdot AsO(OH)_2$, haben Rona und Mitarbeiter[3]) eingehende interessante Versuche angestellt. Für wechselnde Giftkonzentrationen wurde die Beziehung gefunden:

$$\frac{k_A - k_B}{\log B - \log A} = \text{konst } (\varkappa),$$

wo k_A und k_B die Geschwindigkeitskonstanten bei den Giftkonzentrationen A und B bedeuten.

Wirken auf verschiedene Enzymmengen dieselben Giftkonzentrationen, so sind die prozentischen Hemmungen bzw. die „Hemmungskoeffizienten“ $h_A = \frac{k_0 - k_A}{k_0}$ gleich. Also ist $\frac{\varkappa}{k_0} = \text{konst.}$

Das l. c. S. 188 formulierte Ergebnis: „Sowohl die absolute wie die relative Empfindlichkeit des Fermentes gegen das Gift ist bei den verschiedenen Tierarten verschieden“ dürfte durch den Zusatz: „in den entsprechenden Seren“ zu ergänzen sein, da es sich in der erwähnten Untersuchung

---

[1]) Rona u. J. Ebsen, Biochem. Zs 39, 21; 1912.
[2]) Hanriot, C. r. 124, 778; 1897.
[3]) Rona u. Bach, Biochem. Zs 111, 166; 1920. — Rona u. György, ebenda 111, 115; 1920.

eben um Seren, nicht um gereinigte Enzymlösungen handelt, also die übrigen Bestandteile der Seren die „Empfindlichkeit“ wesentlich beeinflussen können.

b) Milch.

Der Nachweis einer Esterase in der Milch ist von Gillet[1]) und Hippius[2]) geführt worden.

Hinsichtlich der von Davidsohn (Biochem. Zs 49) bestimmten optimalen Azidität, etwa pH = 8, stimmt die Esterase der Frauenmilch mit der Pankreas- und Serumesterase angenähert überein und steht mit diesen im Gegensatz zur Magenesterase.

c) Harn.

Im normalen Harn sollen Esterasen nur spurenweise vorhanden sein (Tanfani; Hewlett[3])). Letzterem Forscher zufolge gehen sie nach Störungen im Pankreas in den Harn über; desgleichen bei vermehrtem Lipasegehalt des Blutes bei Fieber und Leukozytenzerfall, ferner bei Nephritis, Ikterus und bei Polyurien (Pribram und Löwy[4])).

Bemerkenswert ist, dass der Speichel keine fett- und esterspaltende Wirkung zeigt.

B. Phyto-Esterasen.

1. Lipasen ölhaltiger Samen.

Green[5]) hat im Jahre 1890 in einer ausgezeichneten Abhandlung „On the germination of the seeds of the Castor-oil plant (Ricinus communis)“ auf die Rolle einer Lipase bei der Keimung von ölhaltigen Samen aufmerksam gemacht, und etwa gleichzeitig ist auch Sigmund[6]) zu ähnlichen Ergebnissen gekommen. Es handelte sich bei den Beobachtungen der beiden Forscher um die Spaltung eigentlicher Fette und Öle. Auf diese Substrate üben die pflanzlichen Esterasen (Lipasen) eine kräftige Wirkung aus. H. E. Armstrong und Ormerod[7]) haben einen Vergleich zwischen der Wirkung einer pflanzlichen (Rizinus) und tierischen Esterase auf verschiedene Substrate ausgeführt; dabei zeigte sich, dass pflanzliche Esterasen vom Typus der Rizinuslipase, welche eine hohe Wirksamkeit gegen eigentliche Fette besitzen, „niedere Ester“ verhältnismässig träge spalten, während z. B. wässerige Leber- oder Pankreasextrakte „niedere Ester“ energischer spalten als Fette und Öle. Immerhin

[1]) Gillet, Jl de Physiol. Pathol. 4, 439; 1902.
[2]) Hippius, Jahrb. Kinderheilk. 61, 365; 1905.
[3]) Hewlett, Jl Med. Research 11, 377; 1904.
[4]) Pribram u. Löwy, H. 76, 489; 1912.
[5]) Green, Proc. Roy. Soc. B. 48, 370; 1890.
[6]) Sigmund, Monatsh. f. Chem. 11, 272; 1900.
[7]) H. E. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B. 76, 606; 1905. — H. E. Armstrong und Ormerod, ebenda 78, 376; 1906. — Siehe hierzu auch die Versuche von Falk, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1904; 1913.

werden auch niedere Ester von Rizinuslipase angegriffen, wie folgende Zahlen von Armstrong und Ormerod zeigen:

Anzahl ccm 0,2 n. NaOH,
entsprechend der bei 25° nach 68^h enzymatisch gebildeten Säure.

Ester	Leberesterase	Rizinusesterase
Mandelsaures Äthyl	1,4	2,0
Benzoesaures Äthyl	3,9	0,8
Salizylsaures Methyl	0,3	0,4
Essigsaures Äthyl	10,35	9,9

Auch Glyzerinester sulfonierter Fettsäuren werden durch Rizinuslipase gespalten[1]).

Wie Connstein, Hoyer und Wartenberg[2]), denen man eine grundlegende Arbeit über Pflanzenlipasen verdankt, gefunden haben, werden von Rizinusenzym „sämtliche, technisch in Betracht kommenden Fette" gespalten, allerdings nicht mit der gleichen Leichtigkeit. „Besonders in die Augen springend war das Verhalten der Butter, denn dieses Fett setzte den Spaltungsversuchen einen recht erheblichen Widerstand entgegen."

Enzymmaterial. Nach Connstein, Hoyer und Wartenberg kommt die fettspaltende Wirkung nicht allen Pflanzensamen in gleich hohem Maasse zu, und zwar sind die Samen der Euphorbiaceen und speziell der Rizinusarten in dieser Hinsicht den übrigen untersuchten Samen wesentlich überlegen. Die von den genannten Forschern angewandten Rizinussamen bestanden aus:

47—51 % Rizinusöl, 28 % Schalen, 21—25 % Kuchen.

Die Samen werden zweckmässig in entschältem und entöltem Zustand angewandt. Das Rizinusöl kann man entweder kalt auspressen[3]) oder kalt extrahieren, ohne dem Enzym zu schaden; „insbesondere ist eine Behandlung des Samens mit Äther oder Schwefelkohlenstoff völlig indifferent". (Falk und Nelson[4]) wandten zur Extraktion Chloroform oder Tetrachlorkohlenstoff an.) Die Anreicherung der Enzympräparate an wirksamer Substanz hat Hoyer[5]) bearbeitet.

George Falk[6]) vertritt die Auffassung, dass in manchen Pflanzensamen, z. B. Rizinussamen — wie übrigens auch in tierischen Organen — zwei verschiedene esterspaltende Enzyme enthalten sind, nämlich teils eine eigentliche Lipase, welche Fette und Öle angreift und durch ihre Löslichkeit in 1,5 n. Natriumchloridlösung charakterisiert sein soll, und eine Esterase, welche

---

[1]) Dubose, Caoutschouc et Guttapercha 16; 1919. Zitiert nach Zblt f. Bioch. 22, 307; 1920.

[2]) Connstein, Hoyer u. Wartenberg, Chem. Ber. 35, 3988; 1902.

[3]) Siehe hierzu auch Tanaka, Jl Coll. Engin. Tokyo 5, 125; 1912.

[4]) Falk u. Nelson, Jl Amer. Chem. Soc. 34, 735; 1912.

[5]) Hoyer, Chem. Ber. 37, 1436; 1904.

[6]) Falk, Proc. Nat. Acad. of Science 1, 136, 1915. — Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1904; 1913.

niedere Ester hydrolysiert und mit einer in Wasser löslichen Substanz verbunden sein soll.

Nicloux[1]) verwendet zu seinen quantitativen Versuchen in Cottonöl suspendiertes Zytoplasma, und Jalander[2]) ist diesem Beispiel gelegentlich gefolgt. Beide Forscher geben auch Vorschriften zur Herstellung von fettfreier, trockener und gereinigter Rizinuslipase.

200 g geschälte Rizinussamen werden fein zerstossen und mit 250 g Cottonöl innig verrieben. Man filtriert durch einen Leinenbeutel und zentrifugiert; dabei erhält man einen Bodensatz von gröberen, unwirksamen Teilchen und 230—250 g Aufschlemmung. Diese wird entölt, indem man zunächst der Aufschlemmung das gleiche Volumen Petroläther zumischt und absetzen lässt. Nach dem Abdekantieren wird der Bodensatz vollständig entölt. Die als weisses Pulver erhaltene Trockenmenge Enzym beträgt 2,5—3% der verarbeiteten Samenmenge.

Willstätter[3]) hat neuerdings Verfahren zur Überführung der Lipasen, besonders des Rizinusenzyms in haltbare, trockene Form angegeben; dieselben bestehen in der Aufnahme der Lipasen aus Emulsionen und Suspensionen mit chemisch indifferenten Stoffen von grosser spezifischer Oberfläche, z. B. mit Kieselgur, Ton, Kaolin, Talk, Kohle oder Baryumsulfat.

Die Patentschrift gibt u. a. folgendes Beispiel:

Aus 1 kg geschältem Rizinussamen wird durch Verreiben mit 14 kg Wasser eine Milch hergestellt und diese bei einer Minutenumdrehungszahl von ungefähr 3000 zentrifugiert. Die entstandene Sahne, die ihre lipatische Wirksamkeit beim Entfetten oder Trocknen einbüssen würde, hebt man ab und verreibt sie innig mit 333 g Kieselgur. Das teigförmige Gemisch wird dann entweder in einer einzigen Operation durch Anrühren und Waschen mit Azeton, Alkohol u. dgl. zugleich entfettet und getrocknet, oder es wird zuerst in Trocknungsapparaten entwässert und dann durch Extraktion mit Lösungsmitteln entölt.

Spaltungsprobe: 0,2944 g Kieselgurlipase (entsprechend 1 g ungeschältem Samen) ergaben mit 2,5 g Rüböl und mit 2 g Wasser bei 20° in 20 Minuten 18,5% Verseifung.

Ausser Rizinussamen sind noch zahlreiche andere ölhaltige Samen untersucht worden, so z. B. Kokosnuss[4]), Kolanuss[5]), Erdnuss (Arachis)[6]), Lein[6]), Mandeln[7]) und besonders Sojabohnen[8]) und Chelidoniumsamen[9]). Es sei ferner auf die Arbeiten von Fokin[10]) und Gerber[11]) verwiesen.

[1]) Nicloux, Soc. Biol. 56, 701—868; ebenda 57, 84, 175; 1904.
[2]) Jalander, Biochem. Zs 36, 435; 1911.
[3]) Willstätter, D.R.P. Nr. 316504, Kl. 12 o, Gr. 26, 1918.
[4]) Lumia, Malys Jahrb. 1898, 724.
[5]) Mastbaum, Chem. Zbt. 78, I, 978; 1907. — J. H. Driessen, Pharm. Weekblad 46; 1909.
[6]) Dunlap u. Seymour, Jl Amer. Chem. Soc. 27, 935; 1905.
[7]) Tonegutti, Staz. sperim. agrar. ital. 43, 723; 1910. — Chem. Zbt. 82, I, 332; 1911.
[8]) Falk, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 649; 1915.
[9]) Bournot, Biochem. Zs 52, 172; 1913 und 65, 140; 1914.
[10]) Fokin, Chem. Zbt. 74, II, 1451; 1903. — 75, II, 1617; 1904.
[11]) Gerber, C. r. 152, 1611; 1911.

Für die Darstellung aus Sojabohnen gibt Falk zwei Arbeitsmethoden an: 1. Gelbe, gemahlene Sojabohnen werden in einem Soxhletapparat mit Äther extrahiert, an der Luft getrocknet, gemahlen und gesiebt. 2. Man befreit die Sojabohnen mit der Hand von ihren Schalen, mahlt die Kerne, extrahiert mit Äther, trocknet an der Luft und siebt. Solche Sojapräparate hat Falk gegen Glyzeryltriazetat recht aktiv gefunden, viel weniger gegen Äthylbutyrat.

Ein von Falk in ähnlicher Weise hergestelltes Präparat aus Rizinussamen enthielt 7,5% Asche. Die Aschenanalyse ergab:

SiO_2	0,5%	MgO	26,0%
CaO	3,8%	P_2O_5	46,2%.

Für die von Falk[1]) nach der Angabe in Jl Amer. Chem. Soc. 37, 223; 1916 dargestellte Esterase fanden Falk und Sugiura[2]) 16—17% N. Dagegen gab die Lipase L I (ebenda S. 227) 17,9%, ber. auf wasser- und aschenfreies Material; L II gab 17,9% bzw. 18,4% N.

Ein Lipasepräparat aus Sojabohnen gab 15,5% N.

Nach Nicloux (l. c.) wirkt das von Rizinussamen abgetrennte Zytoplasma zwar wie ein Enzym; da er aber fand, dass die aktive Substanz von Wasser zerstört wird sobald keine Schutzwirkung durch Fette ausgeübt wird, so zählt er sie — auffallenderweise — nicht zu den Enzymen.

Schon Green gibt an, dass das Enzym nur in dem Endosperm des Rizinus vorhanden ist, nicht im Embryo.

Im ruhenden Samen von Rizinus ist Lipase nach Green nicht in aktivem Zustand vorhanden, sondern als Zymogen. Die Aktivierung des Zymogens wird durch Säuren erreicht; nach Nicloux wäre die Aktivierung proportional der Säuremenge[3]); Hoyer glaubte die in den Samen wirksame Säure als Milchsäure ansprechen zu können.

H. E. Armstrong und Gosney (Proc. Roy. Soc. B 86, 586; 1913) betrachten das Zymogen als ein „esterartiges Salz“, das durch Säuren neutralisiert wird.

Aziditätsoptimum. Die Esterasen ölhaltiger Samen wirken in ausgesprochen saurer Lösung. Aus den Messungen von Jalander hat Sörensen eine optimale Azidität von ca. pH = 3 ermittelt[4]). Armstrong und Ormerod (l. c.) fanden keinen Zusammenhang zwischen der aktivierenden Wirkung verschiedener Säuren und ihren Dissoziationskonstanten. Dies entspricht auch dem früheren Befund von Hoyer[4]).

[1]) Falk, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 601; 1913.

[2]) Falk u. Sugiura, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 921; 1916.

[3]) Siehe aber Connstein, Hoyer u. Wartenberg, l. c. 3995 u. f., sowie Hoyer, Chem. Ber. 37, 1436; 1904.

[4]) Siehe hierzu auch Hoyer, Chem. Ber. 37, 1436; 1904.

Konzentration der Säure	0,01 norm.	0,02 norm	0,10 norm.	0,50 norm.	K · 10^5
Essigsäure	5,45	14,9	14,6	13,6	1,8
Bernsteinsäure	2,80	14,6	15,4	12,2	6
Zitronensäure	7,25	15,3	14,7	1,1	82
Weinsäure	6,95	15,4	14,2	—	97

Die Art der zugesetzten Säuren scheint hiernach ohne erheblichen Einfluss zu sein, was so gedacht werden kann, dass durch sie nur der eigentliche Aktivator, vermutlich selbst eine schwache Säure, ev. Milchsäure, freigemacht wird. Es bleibt noch zu untersuchen, ob die zugesetzten Säuren auch in anderer Weise wirken als durch Einstellung der optimalen Azidität.

Aktivatoren und Paralysatoren. Was zunächst unspezifische Wirkungen betrifft, so tritt eine Beschleunigung mit manchen Neutralsalzen in ziemlich starker Konzentration ein (Tanaka[1]). Eine eingehendere Untersuchung verdankt man Falk[2]).

Besonders wirkt $MgSO_4$ noch in 0,1 molaren Lösungen beschleunigend; überhaupt zeigt SO_4''-Ion einen aktivierenden Einfluss; ferner wurden Beschleunigungen erzielt mit verdünnteren Lösungen von $BaCl_2$ und $CaCl_2$. Alle Salze mit einwertigen Ionen und — abgesehen von den grössten Verdünnungen — die Chloride von Baryum und Kalzium verzögern. Kaliumsulfat ist ohne Einwirkung.

NaF ist nach Connstein, Hoyer und Wartenberg ein starker Paralysator, ebenso $HgCl_2$, ferner Formaldehyd; Chloralhydrat ist unschädlich.

Als spezifische Wirkungen sind wohl diejenigen des Mangansulfats (0,2 % vom angew. Öl) und Manganchlorids anzusehen[3]).

Nach Falk[4]) kann Hitze-inaktivierte Lipase teilweise durch Mangansalze reaktiviert werden, welche dabei als Sauerstoffüberträger wirken sollen.

Hervorzuheben ist die Wirkungslosigkeit der Gallensäuren gegenüber Phytolipasen (Donath[5])).

Alkohol und Azeton verzögern[6]). Immerhin wirkt Rizinusenzym auf Methylazetat auch in wassergesättigtem Äther und wässerigem Azeton[7]).

Einfluss der Temperatur. Phytolipase scheint zu den besonders hitzeempfindlichen Enzymen gerechnet werden zu müssen. Connstein, Hoyer und Wartenberg geben an, dass bei 50° die Fettspaltung schon gehemmt wird. Trockene Präparate sind natürlich weit weniger empfindlich[8]) als solche in Berührung mit Wasser (vergl. Bd. I, S. 184).

---

[1]) Tanaka, Jl Coll. Eng. Tokyo 5, 142; 1912.
[2]) Falk, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 601; 1913.
[3]) Hoyer, Seifensiederztg. 32; 1905. — Chem. Zbl. 76, 582; 1905. — Falk und Hamlin, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 210; 1913.
[4]) Falk, Proc. Nat. Acad. of Science, 1, 136; 1915.
[5]) Donath, Hofm. Beitr. 10, 390; 1907.
[6]) Falk, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 616; 1913.
[7]) Falk u. Nelson, Jl Amer. Chem. Soc. 34, 735; 1912.
[8]) Falk, Proc. Nat. Acad. of Science, 2, 557; 1916.

Wie immer ist die Stabilität des Enzyms sowohl bei Zimmertemperatur als bei höheren Wärmegraden eine Funktion der Azidität (Bd. I, S. 179 und Falk, Jl Biol. Chem. 31, S. 102).

Kinetik.

Nicloux[1]) verdankt man die ersten ausführlicheren Versuche über Rizinuslipasen oder, wie dieser Verfasser sagt, über die lipolytische Wirkung des Zytoplasmas von Rizinussamen. Nicloux fand sein Präparat unlöslich in Wasser; er emulgierte das Zytoplasma in dem zu hydrolysierenden Öl, meist Baumwollöl, und setzte verdünnte Essigsäure zu. Folgende Zahlen sind bei 18° erhalten:

t Min.	30	45	60	90	127	150	210	450
Hydrolys. in %	23,6	33,1	40,4	54,8	67,0	73,2	85,5	94,4
$k = \frac{100}{t} \log \frac{100}{100 - x}$	0,388	0,387	0,375	0,382	0,392	0,381	0,399	0,278

Der Schützschen Regel folgen die beobachteten Zahlen nicht. Dagegen gibt die für monomolekulare Reaktionen gültige Formel den beobachteten Gang der Hydrolyse ziemlich gut wieder.

Das Zeitgesetz der pflanzlichen Lipasen ist bald darauf auch von Connstein, Hoyer und Wartenberg eingehend untersucht worden. Dieselben haben zunächst die wesentliche Tatsache festgestellt, dass erhebliche Mengen freier Säure notwendig sind, um die Lipase zur Wirksamkeit gelangen zu lassen. Verreibt man nach Sigmunds Vorschrift (Monatsh. f. Chemie 11, 272; 1890) pulverisierte Rizinussamen mit Wasser und überlässt sie während 24 Stunden bei ca. 40° sich selbst, so beobachtet man tatsächlich nach Ablauf dieser Zeit durch Titrieren des Gemenges das Auftreten geringer Mengen Säure; lässt man solche Proben noch mehrere Tage stehen, so erfolgt nach einiger Zeit ein sprungweises rapides Ansteigen der Säuremenge. Dieser „Sprung“ tritt je nach der höheren (35—40°) oder niedrigeren (15—20°) Temperatur des Ansatzes bald früher (nach 2—3 Tagen), bald später (nach 4—6 Tagen) in Erscheinung.

5 g Rizinussamen mit 5 g 1%iger Chloralhydratlösung verrieben und bei 16° sich selbst überlassen:

Gefunden	sofort	nach 2 Tagen	4 Tagen	6 Tagen	8 Tagen
% Rizinusölsäure	1	3	52	59	59

Wir haben es hier mit einem Fall von Autokatalyse zu tun, wo also eines der Reaktionsprodukte den Fortgang der Reaktion beschleunigt.

Wie oben erwähnt, liegt die optimale Azidität etwa bei pH = 3.

In so stark sauren Lösungen ist ausser den Samenlipasen nur noch Pepsin wirksam. Der Gedanke, dass durch die Säure ein in den Samen vorhandenes Proenzym (Zymogen) in ein wirksames Enzym umgewandelt werde, ist nach den genannten Autoren zurückzuweisen,

[1]) Nicloux, Soc. Biol. 54, 840; 1902.

[2]) Connstein, Hoyer u. Wartenberg, Chem. Ber. 35, 3988; 1903.

denn wenn man die Samen längere Zeit mit dieser Säure behandelt, und die letztere dann entfernt, so ist in dem zurückbleibenden Samen keinerlei Veränderung zu konstatieren; derselbe wirkt in neutraler Lösung ebensowenig fettspaltend, wie vor der Säurebehandlung, und seine Wirksamkeit kann nur durch erneuten Säurezusatz hervorgerufen werden.

Um den Einfluss der Enzymmenge auf die Spaltungsgeschwindigkeit festzustellen, wurden 0,5 g Rizinussamen mit 5, 10, 15, 20, 25 und 50 g Rizinusöl und mit den gleichen Mengen 2%iger Essigsäure zur Emulsion verrieben.

0,5 g Rizinussamen wirken auf		x	
g Öl	g Essigsäurelös.	1 Tag	2 Tage
50	50	49	49
25	25	60	74
20	20	71	80
15	15	77	87
10	10	81	86
5	5	89	92

Über den zeitlichen Verlauf der Spaltung geben zahlreiche Versuche, unter anderen 38 und 46 Aufschluss. Die beiden letzteren sind folgendermassen angestellt: 5 g Rizinussamen wurden mit 6,5 g Rizinusöl und 4 g 0,1 n. Schwefelsäure bzw. 4 g Essigsäure verrieben.

Vers. 46.		Vers. 38.			
0,10 n. Schwefelsäure		0,10 n. Essigsäure		0,40 n. Essigsäure	
t Min.	x beob.	t Std.	x beob.	t Std.	x beob.
15	12	1	52	1	65
30	20	2	65	2	86
45	30	3	70	3	84
60	33	4	72	4	84
90	41	24	80	24	91
150	54				
210	59				
330	68				
1620	81				

Auch A. E. Taylor, welcher Triazetin, den Essigsäureester des Glyzerins, mit dem Pulver von Rizinusbohnen hydrolysiert hat, fand einen Reaktionsverlauf, wie bei monomolekularen Reaktionen. Er gibt folgende Resultate an, bei welchen $^1/_2$-, 1- und 2%ige Lösungen von Triazetin zur Anwendung kamen. Die Konstanten k beziehen sich auf 18°.

	t Stunden	4	8	16	24	28	32	40	48
$^1/_2$%	x beob.	0,096	0,162	0,287	0,418	0,489	0,477	0,623	0,652
	k	109	96	92	98	104	88	106	96
1%	x beob.	0,083	0,174	0,338	0,418	0,488	0,542	0,609	0,655
	k	94	104	112	98	104	106	102	96
2%	x beob.	0,098	0,174	0,323	0,431	0,502	0,485	0,595	0,636
	k	112	104	106	102	108	90	98	91

Wie es kommt, dass bei diesen Versuchen von Nicloux und Taylor die hydrolysierte Menge Fett nach dem einfachsten Zeitgesetz, welches für

homogene Systeme gilt, berechnet werden kann, lässt sich noch nicht ganz überblicken. Es ist bei der Hydrolyse von Fetten und Triazetin um so auffallender, als wir ja hier drei stufenweise verlaufende Hydrolysen haben, welche wohl mit verschiedener Geschwindigkeit stattfinden.

Nicloux hatte bei kleinen Enzymmengen E und Versuchszeiten die gespaltenen Substratmengen den Enzymmengen proportional gefunden. Dies wird durch Messungen von Jalander[1]) bestätigt.

Je 1,0 g Cottonöl, 1 ccm 0,01 n. Essigsäure. Temperatur 22°. Versuchsdauer 30 Minuten (Tab. XX).

Enzymmenge E (Rizinuslipase in Aufschlemmung)	Verbrauchte ccm 0,1 n. Natronlauge	Gespalten, % x	$\frac{x}{E}$
0,001	1,68	4,46	4,46
0,002	3,40	9,04	4,52
0,003	5,21	13,85	4,65
0.004	6,70	17,82	4.45
0,005	8,31	22,10	4,40
0,010	15,63	41,57	4,16
0,015	19,96	53,08	3,54
0.020	22,18	58,99	2,99
0.025	23,05	61,30	2,41

Was den zeitlichen Verlauf der Fettspaltung betrifft, so fand Jalander in der Regel einen befriedigenden Anschluss an die Schützsche Regel, während die Reaktionskoeffizienten erster Ordnung fielen.

Je 0,02 g trockene Rizinuslipase, 1,0 g Triolein, 1,0 ccm 0,01 n. Essigsäure. Temperatur 20°. Nach sorgfältiger Emulsionierung während der ganzen Versuchsdauer maschinell geschüttelt (Tab. XXXIII).

Minuten t	0,1 n. NaOH ccm	% gespalten x	$\frac{x}{\sqrt{t}}$	$\frac{10^4}{t} \lg \frac{a}{a-x}$
10	6,76	20,39	6,4	100
20	11,55	34,87	7,8	93,0
30	15,93	48,05	8,7	93,9
60	18,85	56,86	7,3	60,6
120	26,18	78.97	7,2	56,2
240	28,54	86,54	5,7	35,7

Synthetische Wirkungen.

Taylor[2]), S. Iwanow[3]), Welter[4]), Jalander (l. c.) und Krauss[5]) haben mit Rizinusenzym Synthesen durchführen können, wobei auch die Zwischenprodukte, Mono- und Dioleine, beobachtet wurden (Krauss). Der nachfolgende Versuch von Jalander zeigt, dass von beiden Seiten her die gleiche Gleichgewichtslage erreicht wurde (Vers. 8).

[1]) Jalander, Biochem. Zs 36, 435; 1911.
[2]) Taylor, Publ. Univ. California I, 33: 1904.
[3]) Serg. Iwanow, Bot. Ber. 29, 595; 1911.
[4]) Welter, Zs angew. Chem. 24, 385; 1911.
[5]) Krauss, Zs angew. Chem. 24, 829; 1911.

Temperatur 20°. 5mal täglich je 2 Minuten lang geschüttelt.

A. Esterspaltung.
0,01 g trockene Rizinuslipase, 1,0 g Triolein, 1 ccm 0,01 n. Essigsäure

Dauer Tage	ccm 0,1 n. NaOH	Öl gespalten %
15	29,51	89,02
30	29,30	88,37

B. Esterbildung.
0,01 g trockene Rizinuslipase, 0,957 g Ölsäure, 0,104 g Glyzerin, 1 ccm 0,01 n. Essigsäure

Dauer Tage	ccm 0,1 n. NaOH	Ölsäure geb. %
15	30,31	11,16
30	30,35	11,04

Nach Iwanow wirkt das fettspaltende Enzym je nach der Samenreife synthetisierend oder spaltend. Eine Untersuchung, welchen Einfluss hierbei die Azidität des Mediums hat, wäre in hohem Grade wünschenswert.

Auch mit Enzym aus Chelidoniumsamen konnte Bournot (l. c.) Monoolein und Triolein synthetisieren.

Was die Theorie dieses oder ähnlicher enzymatischer Gleichgewichte betrifft, so dürfte es nunmehr eine der nächsten Aufgaben sein, die Grundannahme, daß enzymatische Reaktionen durch die Verbindungen zwischen Enzym und Substrat vermittelt werden, auf umkehrbare Reaktionen mit messbarer Gleichgewichtslage anzuwenden. Offenbar wird, wie ich schon 1907 betont habe[1]), das natürliche Gleichgewicht durch die Verteilung des Enzyms zwischen Substrat und Reaktionsprodukt, im vorliegenden Fall zwischen Ester und Säure bezw. Alkohol, beeinflusst. Zur Klärung dieser Verhältnisse sind weitere experimentelle Daten erforderlich, welche ich bald mitteilen zu können hoffe.

Technische Anwendung.

Die Ausarbeitung der enzymatischen Fettspaltung durch Phytolipasen als technisches Verfahren verdankt man Connstein, Hoyer und Wartenberg. D. R. P. Kl. 23d 145413 und 147757; 1902. Ver. Chem. Werke Charlottenburg.

Die Trennung des Protoplasmas von anderen Bestandteilen des Rizinussamens, Öl und Aleuron, durch Zentrifugieren hat sich Nicloux patentieren lassen D.R.P 188511; 1904. — Ein weiteres Patent von Nicloux, D.R.P. 191113; 1905 betrifft den Zusatz von Kalzium- und Magnesiumsulfat.

Siehe auch das Verfahren von Willstätter (S. 35) D.R.P. 316504 (1919), 3. Beispiel.

C. Esterasen in Pilzen und Mikroorganismen.

Eine Esterase in höheren Pilzen beschreibt Zellner[2]).

In niederen Pilzen sind Esterasen zuerst von Gérard[3]) und Camus[4]) nachgewiesen worden.

[1]) Euler, H. 52. 146; 1907.
[2]) Zellner, Monatsh. f. Chem. 27, 295; 1906. — Chemie der höheren Pilze, Leipzig 1907.
[3]) Gérard, C. r. 124, 370; 1897.
[4]) Camus, Soc. Biol. 49, 192; 230; 1897.

Weitere Literatur über Pilzesterasen:

Aspergillus:
- Biffen, Ann. of Bot. 13, 163; 1899.
- Garnier, Soc. Biol. 55, 1490, 1583; 1903.
- Spieckermann u. Bremer, Landw. Jahrb. 31, 81; 1902.
- Laxa, Arch. f. Hyg. 41, 119; 1902.

Lactarius sanguifluus:
- Rouge, Zbt. f. Bakt. II, 18, 404; 1907.
- Deleano, Biochem. Zs 17, 225; 1909.

Rouge (l. c.) zieht aus seinen Beobachtungen über die Lipase des Lactarius sanguifluus den Schluss, dass in verdünnten Lösungen die Enzymwirkung der angewandten Enzymmenge direkt proportional ist.

Deleano, der mit dem gleichen Pilz gearbeitet hat, nimmt zwei verschiedene Enzyme an, die er mit der Serumesterase und der Pankreasesterase vergleicht. Diese zeigen allerdings, wie aus den früheren Abschnitten zu sehen ist, wenig charakteristische Unterschiede. Der Autor macht auch Angaben über den Einfluss der Temperatur auf diese Enzyme.

In Hefen, welche ja unter geeigneten Bedingungen sehr fettreich werden können, sind vielfach Esterasen nachgewiesen worden.

Neuere Literatur über Fettspaltung durch Bakterien:

- Jensen, Zbt. Bakt. II, 8, 11; 1902.
- Söhngen, Folia microbiologica I. Chem. Zbt. 82, II, 631; 1911.
- Rubner, Arch. f. Hyg. 38, 67; 1900.
- Huss, Zbt. Bkt. II, 20; 1908.
- Fuhrmann, Bakterienenzyme. Jena 1907.

Bemerkenswert ist die Angabe von Söhngen (l. c.), dass eine aus Bac. fluorescens, pyocyaneus, liquefaciens dargestellte, sehr säureempfindliche Esterase eine 5 Minuten lange Erhitzung auf 100° überdauerte. Dem gleichen Forscher zufolge soll die Bakterienesterase erst in 0,02 n. Milchsäure zu wirken aufhören.

Die lipolytische Wirkung der Fäzes entstammt sicher, wie auch Molnár[1]) annimmt, zum Teil den Bakterien.

D. Methoden zur Messung der Fett- und Esterspaltung.

Die Methoden zur Untersuchung der Fettspaltung gründen sich im wesentlichen auf zweierlei Effekte:

1. Die Bildung freier Säure (und freien Alkohols) aus dem Ester.

2. Die Änderung der Oberflächenspannung der Reaktionsflüssigkeit.

[1]) Molnár, D. med. Woch. 43, 326; 1917.

1a. Titrationsmethoden.

Es handelt sich hierbei durchweg um alkalimetrische Titration mit NaOH, zu welcher in der Regel 1%iges Phenolphthalein als Indikator verwendet worden ist.

Soweit niedere Ester, in erster Linie Äthylbutyrat, und einigermassen klare Lösungen von Enzym angewandt worden sind, stimmt die Methodik mehr oder weniger vollständig mit denjenigen überein, welche bei nichtenzymatischen Esterhydrolysen angewandt und mannigfach durchgearbeitet worden sind. Die Anwendung dieser Methodik findet man besonders in den Arbeiten von Kastle und Loevenhart (vergl. S. 27 u. ff.).

Auch wenn es sich um die Spaltung eigentlicher Fette und Öle handelt, so kann die durch die Reaktion gebildete Säure mittels Alkali direkt titriert werden, wie dies in den Arbeiten von Dietz u. a. geschehen ist.

Im allgemeinen wurde zur Herstellung einer homogenen Lösung die Fettemulsion vor der Titration mit Alkohol versetzt[1]). In denjenigen Fällen, in welchen das Enzym in fester bzw. in nicht vollständig gelöster Form zur Anwendung gekommen ist, wie bei den Versuchen von Connstein, Hoyer und Wartenberg (siehe S. 34), liefert nach der Erfahrung dieser Forscher die Titration „niemals zu hohe, eher aber öfter zu niedrige Werte, da es sehr schwer ist, die in dem Samengemenge enthaltende Fettsäure dem ersteren bis auf die letzten Spuren durch Extraktion zu entziehen“.

Beim Arbeiten mit pflanzlichen Lipasen werden die Samen geschält, durch Auspressen und Behandeln des Presskuchens mit Äther von Öl befreit und fein gemahlen. Die gebildete Samenmilch wird in einer Zentrifuge von den unwirksamen Bestandteilen des Samens getrennt. Man lässt sie 24 Stunden stehen, unterdessen sammelt sich die enzymhaltige Emulsion, in welcher sich die zur Aktivierung nötige Säure (Milchsäure) bildet, an der Oberfläche an und kann abgehoben werden. Mit 5—10 g dieser Emulsion verrührt man 100 g Öl und 0,2 g Manganosulfat und entnimmt der Mischung von Zeit zu Zeit Proben zur Titration.

Über die Herstellung von Ölemulsionen siehe auch Jalander (l. c.).

Methode von Volhard-Stade[2]).

Volhard und seine Schüler verwenden als Substrat Eigelbemulsion. Die Titration nehmen sie nicht direkt mit einem aliquoten Teil des Reaktionsgemisches vor, sondern sie schütteln dieses, bzw. einen Teil desselben, mit Äther und etwas Alkohol aus und titrieren einen gemessenen Teil des Ätherextraktes mit Natronlauge. Die Methode stellt sich also folgendermassen:

[1]) Siehe z. B. Kanitz, Chem. Ber. 36, 400; 1903. — H. 46, 482; 1905. — Terroine Biochem. Zs 23, 404; 1910.

[2]) Stade, Hofm. Beitr. 3, 291; 1903.

Gleiche Mengen des Verdauungsgemisches werden in 100—150 ccm fassende Flaschen gebracht, mit 75 ccm Äther, zur Beschleunigung der Schichtung unter Zusatz von Alkohol[1]) übergossen und, gut verkorkt, gleich lang maschinell geschüttelt.

Sobald sich nach Beendigung des Schüttelns der Ather von dem Verdauungsgemisch getrennt und geklärt hat, werden 50 ccm desselben in ein Kölbchen abgegossen, mit 75 ccm neutralisierten Alkohols versetzt und mit wässeriger 0,1 n. NaOH titriert. Bestimmung I.

Zur Ermittelung der Totalmenge des anwesenden verseifbaren Fettes werden nun 10 ccm 1 n. Natronlauge zugegeben und die Kölbchen 24 Stunden unter dem Rückflusskühler verseift. Die aus den Neutralfetten so gebildeten Seifen werden durch 10 ccm 1 n. H_2SO_4 gespalten, wobei gleichzeitig das überschüssige Alkali gebunden wird, und durch eine zweite Titration die Neutralfette als Fettsäuren bestimmt. Bestimmung II.

Die Berechnung geschieht nach der Formel $I : I + II = x : 100$.

Verwendet man nicht Eigelbemulsion, sondern Fett- bzw. Ölemulsion, so ist die Wahl des Öles und die Herstellung der Emulsion wesentlich für den Verlauf der Spaltung. Umeda[2]) empfiehlt Arachis-Öl und gibt eine Methode zur Herstellung einer gleichmässigen Emulsion an.

Bei Zusatz von Bikarbonat zur Reaktionslösung lassen sich die abgespaltenen Fettsäuren nicht direkt titrieren. Die Methode von Abderhalden und Weil[3]) umgeht diese Schwierigkeit, indem nach Beendigung des Versuches und Abkühlen auf etwa 10° von dem Pankreasgewebe, dem nicht gespaltenen Fett und dem unlöslichen Natriumstearat abfiltriert und das dem anfangs zugesetzten Bikarbonat entsprechende Volumen n/10 Schwefelsäure hinzugefügt wird. Durch kurzes Aufkochen am Rückflusskühler wurde die frei gewordene Kohlensäure entfernt. Die nach dem schnellen Abkühlen auf Zimmertemperatur und Zusatz von drei Tropfen 1 proz. Phenolphthaleinlösung bis zur schwach rosa Färbung verbrauchte Menge n/10 NaOH entsprach dann der aus dem Fett abgespaltenen Menge Säure. Stearinsäure wurde noch direkt als Bleistearat bestimmt.

Eine vereinfachte Methode, die Lipasen im Duodenalinhalt zu bestimmen, welche vielleicht zu klinischen Zwecken ausreichend ist, beschreiben Bondi u. Volk (Wien. klin. Woch. 32, 141; 1919).

Mauban verwendet zur Bestimmung des durch direkte Duodenalsondierung gewonnenen Pankreassaftes Fettgelatineplatten (Soc. Biol. 83, 130; 1920).

1b. Bestimmung des gebildeten Glyzerins.

St. v. Pesthy[4]) hat bei seinen Versuchen, die mit Magen- und Pankreasenzym und mit Eigelb oder Olivenöl als Substrat angestellt wurden, sowohl die entstehenden Säuren titriert als auch das Glyzerin nach Zeisel-Fanto bestimmt.

---

[1]) Siehe hierzu Engel, Hofm. Beitr. 7, 77; 1905.
[2]) Umeda, Biochem. Jl 9, 38; 1915.
[3]) Abderhalden und Weil, Fermentf. 4, 86; 1920.
[4]) v. Pesthy, Biochem. Zs. 34, 147; 1911.

Die Reaktionsflüssigkeit wurde verdünnt, mit Essigsäure angesäuert und mit einer 10%igen Lösung von Phosphorwolframsäure im Überschuss versetzt. Der hierbei entstandene Niederschlag besteht aus gefälltem Eiweiss, das auch die Fette der Emulsion mit sich reisst. Die Flüssigkeit wird auf einer Nutsche abgesaugt; es wird mit dest. Wasser gewaschen, aus dem opalisierenden Filtrat die Phosphorwolframsäure mit Baryt gefällt, filtriert und im Filtrat der überschüssige Baryt durch CO_2 entfernt. Aus dem nunmehr barytfreien Filtrat werden die Chloride durch frisch gefälltes Silberoxyd gefällt und durch Filtration entfernt. Im eingeengten Filtrat wird nunmehr das Glyzerin nach Zeisel und Fanto bestimmt[1]). Die Methode besteht bekanntlich darin, dass die Glyzerin enthaltende Lösung, mit JH gekocht, flüchtiges Isopropyljodid gibt, das, in eine alkoholische Lösung von $AgNO_3$ geleitet, dort einen Niederschlag von AgJ bildet, welcher zur Wägung gebracht und auf Glyzerin berechnet wird.

2. Stalagmometrische Methode.

Die Titrationsmethoden zur Messung der Fettspaltung sind von Saxl[2]) einer, allerdings übertrieben, abfälligen Kritik unterzogen worden, mit dem Resultat, dass „keine der bisher empfohlenen Methoden ein quantitatives Studium der Esterspaltung gestattet, da die gewonnenen Werte entweder bei kurzer Versuchsdauer so gering sind, dass sie kaum ausserhalb der Fehlergrenzen liegen, oder aber bei langer Versuchsdauer durch die mit den Bestimmungsmethoden verbundenen Fehlerquellen getrübt werden."

Rona und Michaelis[3]) haben zur Vermeidung dieses Übelstandes eine Methode ausgearbeitet, bei welcher sie Äthylbutyrat als Substrat verwenden und den Gang der Reaktion durch die Änderung der Oberflächenspannung verfolgen, welche infolge der Esterspaltung eintritt. Diese Methode ist nur unter Verwendung echter Lösungen, also niederer Ester, anwendbar; bei Verwendung von Fettemulsionen dürfte eine stalagmometrische Methode, wie sie Izar (Biochem. Zs 40, 390; 1912) vorgeschlagen hat, nicht brauchbar sein.

Die Glyzerinester erniedrigen die Oberflächenspannung des Wassers selbst in geringen Konzentrationen bedeutend, während die Spaltprodukte auf die Oberflächenspannung eine verhältnismässig geringe Wirkung ausüben. Die äusserst geringen Mengen Tributyrin, welche in wässerige Lösung gehen, genügen schon, um die Oberflächenspannung des Wassers stark zu erniedrigen.

Als Messapparat eignet sich ein Traubesches Stalagmometer, mit welchem die Tropfenzahl ermittelt wird, die beim Entleeren eines bestimmten Volumens der Flüssigkeit gebildet wird; diese Tropfenzahl ist ein Mass der relativen Oberflächenspannung.

Die Methode von Rona und Michaelis ist bald von Davidsohn[4]) in etwas abgeänderter Form angewandt worden.

---

[1]) Zeisel u. Fanto, Zs f. anal. Chem. 42, 549; 1903.

[2]) Saxl, Biochem. Zs 12, 343; 1908. Siehe auch Freudenberg, Biochem. Zs. 45, 469.

[3]) Rona u. Michaelis, Biochem. Zs 31, 345; 1911. — Rona, Biochem. Zs. 32, 482; 1911.

[4]) Davidsohn, Berl. klin. Woch. 49, 1132; 1912.

Davidsohn verfährt zur Bestimmung der fettspaltenden Wirkung des Magensaftes folgendermassen:

Der nach Probefrühstück gewonnene und filtrierte Mageninhalt wird 2-, 4- und 8fach verdünnt. Von diesen Verdünnungen und eventuell dem unverdünnten Saft werden 0,5 bzw. 0,75 und 1,0 ccm mit 60 ccm einer gesättigten wässerigen Tributyrinlösung versetzt. Es empfiehlt sich zunächst, 4 Verdünnungen mit je 4 bis 5 Minuten Zwischenraum anzusetzen. Das Intervall genügt zu einer Messung und nach 60 Minuten sieht man, ob man weiter stärkere oder schwächere Verdünnungen wählen muss. Eine Sättigung der Lösung mit Tributyrin tritt erst allmählich und nach kräftigem Schütteln mit einem grossen Überschuss Tributyrin ein. Es muss jede neue Lösung auf ihren richtigen Gehalt mit der Tropfmethode geprüft werden. Für gleiche Temperatur der verwendeten Flüssigkeiten ist zu sorgen. Die optimale Azidität wird durch einen Zusatz von 0,5 ccm $^1/_8$ n. H_2KPO_4 und 0,5 ccm $^1/_8$ n. HNa_2PO_4 hergestellt.

Sofort nach dem Vermischen der Tributyrinlösung mit dem Magensaft, und dann stets nach 20 Minuten, werden Proben abgefüllt und gemessen. Die von Davidsohn benutzte Kapillare war so beschaffen, dass der Wert für die Tributyrinlösung 144, für reines Wasser 94 Tropfen betrug. Die Spaltung der Tributyrinlösung durch Magensaft geht nun so vor sich, dass zunächst bis zu einem Wert von etwa 110 Tropfen eine schnelle Änderung eintritt, die dann asymptotisch bis ungefähr 100 Tropfen weiter verläuft.

Die Kapillare ist vor jedem Versuch mit einer kleinen Menge der zu prüfenden Flüssigkeit zu waschen.

Eine Methode zum schnellen Nachweis von Esterasen, besonders Phenolesterasen, die sich auf die Anwendung von Guajakolkarbonat gründet, hat A. Bach[1]) angegeben.

Anhang. Besondere esterspaltende Enzyme.

1. Lezithase.

Die Existenz eines besonderen Enzyms, welches Lezithin,

```
        OH
       /
CH2OPO — OCH2 · CH3 · N(CH3)3OH
|
CHOR
|
CH2OR
```

(R = Palmitin-, Stearin- oder Ölsäure.)

sowie Derivate desselben und eventuell andere Phosphatide) hydrolytisch spaltet, wurde von Cohnstein und Michaelis (1894), von Hamburger (1900) und neuerdings von F. H. Thiele[2]) behauptet, welche dieses Enzym

[1]) A. Bach, Fermentforschung 1, 151; 1915.

[2]) F. H. Thiele, Biochem. Jl 7, 275; 1913.

im Blut und Chylus fanden. Im normalen Serum soll sich diese Lezithase nicht finden, sondern an die geformten Elemente des Blutes (nicht an das Hämoglobin) gebunden sein, wie dies auch bei der Esterase des Blutes der Fall ist (vergl. S. 31).

Lezithin wird von Enzymen des Magens[1]), des Pankreas[2]) und des Darmes[3]) kräftig angegriffen, auch von einem Enzym der Leber[4]), der Lunge (Fr. Müller) und anderer Organe, ferner im Dotter des Hühnereis[5]).

Im Gegensatz zu P. Mayer und zu Wohlgemuth konnten Stassano und Billon[6]), sowie auch Kalaboukoff und Terroine[7]) keine Lezithinspaltung durch den Pankreassaft nachweisen.

Von besonderem Interesse ist die von Neuberg[8]) entdeckte enzymatische Lezithinspaltung durch eine Reihe natürlich vorkommender Hämolysine und Agglutinine. Dass nach Neuberg und K. Reicher[9]) für Magen- und Pankreassaft ein Parallelismus zwischen Hämolyse und Fettspaltung besteht, ist schon S. 20 erwähnt worden; das gleiche gilt auch für bakterizide, antitoxische, zytolytische und bakteriolytische Sera[10]).

Auch Bergel[11]) vertritt die Auffassung, dass die Hämolyse durch die Auflösung und Spaltung der Membranlipoide veranlasst wird.

Olsen und Goette[12]), welche in letzter Zeit die Serumhämolyse und -lipolyse verglichen haben, kommen zur Auffassung, dass „das unter den verschiedensten Bedingungen übereinstimmende Verhalten zum mindesten sehr für einen weitgehenden Parallelismus dieser Serumwirkungen spricht".

Fiessinger und Clogne[13]) nehmen in den Leukozythen neben der eigentlichen Lipase noch eine Lezithinase (Lipoidase) an, indem sie angeben, dass letzteres Enzym erheblich thermolabiler ist als die Lipase; es wird durch halbstündiges Erhitzen auf 56°—60° zerstört. Die Reaktion dieser Lezithinase wird deutlich, „wenn 2—4 Millionen Leukozythen auf 1 ccm 1/100 Lezithin-

[1]) Schumoff-Simanowski u. Sieber, H. 49, 50; 1906. — Usuki, Arch. f. exp. Path. 63, 270; 1910.

[2]) Paul Mayer, Biochem. Zs 1, 39; 1906. — Clementi, Arch. di Fisiol. 8, 399; 1910. — Wohlgemuth, Biochem. Zs 39, 302; 1912.

[3]) Brugsch u. Masuda, Zs exp. Path. 8, 617; 1911. — Ugo Lombroso, Arch. di Farmac. sper. 13, 73; 1912.

[4]) Waldvogel, H. 42, 200; 1904.

[5]) Wohlgemuth, H. 44, 540; 1905.

[6]) Stassano u. Billon, Soc. Biol. 55, 482; 1903.

[7]) Kalaboukoff u. Terroine, Soc. Biol. 66, 176; 1909.

[8]) Neuberg u. E. Rosenberg, Berl. klin. Woch. 44, 54; 1907.

[9]) Neuberg u. Reicher, Biochem. Zs 4, 281; 1907. — Münch. med. Woch. 54, 1907.

[10]) Siehe auch Rosenheim, Proc. Physiol. Soc., Jl of Physiol. 40, VIII; 1910.

[11]) Bergel, D. med. Woch. 34, 1908, D. Arch. klin. Med. 106, 47; 1912. — Zs Immun. 13, 255; 1912 u. 27, 441; 1918.

[12]) Olsen und Goette, Biochem. Zs. 112, 183; 1920.

[13]) Fiessinger u. Clogne, C. r. 165, 730; 1917.

lösung 10 Tage wirken". Das Optimum der Lezithinspaltung soll in schwach alkalischer Lösung eintreten.

2. Cholesterase.

Dass Ester des Cholesterins durch ein in Leber, Niere und Milz enthaltenes Enzym gespalten werden, hat zuerst Kenro Kondo[1]) gezeigt. Cytronberg[2]) fand ein entsprechendes Enzym auch im Blut. Seine Methodik gründet sich auf die Fällung des Cholesterins durch Digitonin nach Windaus.

In Organen und Geweben, welche Cholesterylester enthalten, hat man auch ein entsprechendes Enzym gefunden. Dagegen besitzt Hirn, welches zwar Cholesterin aber keinen Cholesterinester enthält, keine Cholesterase (Lorrain, Smith und Mair[3]).

Eine sichere Abgrenzung dieses Enzyms von den in den Organen gleichzeitig auftretenden oben behandelten Esterasen liegt noch nicht vor.

Ob ein von anderen Esterasen verschiedenes wachsspaltendes Enzym in den Lymphozyten vorkommt, wie durch Ergebnisse von Bergel[4]) wahrscheinlich wird, bleibt weiteren Untersuchungen zur Entscheidung vorbehalten.

A. E. Porter[5]) fand allerdings ziemlich weitgehende Unterschiede zwischen Lipasen (Esterasen) und dem Enzym, welches die Ester höherer Alkohole (Lanolin, Cholesteryl-Palmitat, Cetylpalmitat u. a.) spaltet, und welches sich neben Butyrasen und Lezithinase in zahlreichen tierischen Organen findet.

Dieses Vorkommen einer Cholesterase wäre bemerkenswert, weil die Tuberkelbazillen eine wachsähnliche Substanz enthalten. Nach Porter (l. c.) scheint die Resistenz verschiedener Organe mit ihrem Gehalt an Esterasen in Beziehung zu stehen. So sind die Organe der Katze, welche wenig empfänglich für Tuberkeln ist, durchweg reich an Esterasen. Andererseits ist bei allen Tierarten die Lunge sehr esterasearm.

Aus der gegen Tuberkelbazillen immunen Raupe der Wachsmotte lässt sich nach Fissinger[6]) ein wachsspaltendes Enzym extrahieren.

3. Chlorophyllase.

Dieses von Willstätter und Stoll[7]) entdeckte Enzym spaltet aus dem Chlorophyll den charakteristischen Alkohol, Phytol, ab, wobei, je nach dem

---

[1]) Kenro Kondo, Biochem. Zs 26, 243 u. 27, 427; 1910.

[2]) Cytronberg, Biochem. Zs 45, 281; 1912. — Siehe auch J. H. Schultz, ebenda 42, 255; 1912.

[3]) Lorrain, Smith und Mair, Jl Path. Bact. 16, 131; 1912.

[4]) Bergel, Münch. med. Woch. 66, 929; 1919.

[5]) Porter, Münch. med. Woch. 61, 1775; 1914. — Biochem. Jl 10, 523; 1916.

[6]) Fiessinger, Soc. Biol. 83, 147; 1920.

[7]) Willstätter u. Stoll, Lieb. Ann. 378, 18; 1911. — Siehe auch Untersuchungen über Chlorophyll. Berlin 1913.

Lösungsmittel, die betreffende Karboxylgruppe frei oder mit Äthyl- bzw. Methylalkohol wieder verestert wird, entsprechend den Formelgleichungen:

1. $[C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2C_{20}H_{39}) + H_2O$
Chlorophyll a
$= [C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(COOH) + C_{20}H_{39}OH$
Chlorophyllid a — Phytol

2. $[C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2C_{20}H_{39}) + C_2H_5OH$
Chlorophyll a
$= [C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2C_2H_5) + C_{20}H_{39}OH$
Äthylchlorophyllid a — Phytol

Die Chlorophyllase konnte in allen untersuchten Pflanzenklassen nachgewiesen werden. Als Material für die präparative Anwendung des Enzyms eignen sich aber nur wenige Pflanzen; besonders gut:

Heracleum spondylium, Galeopsis tetrahit, Stachys silvatica;

anwendbar sind auch:

Lamium maculatum, Datura stramonium und Melittis melissophyllum.

Sehr arm an Chlorophyllase sind: Gras, Platane, Brennessel.

Zwecks Alkoholyse und Hydrolyse durch Chlorophyllase ist die möglichst frische, ungetrocknete Blattsubstanz mit dem sich bildenden oder frisch gebildeten Extrakt in Berührung gebracht worden. Indessen erfordert die Verarbeitung der ungetrockneten Blätter infolge ihres Wassergehaltes ausserordentlich viel Lösungsmittel.

Daher ist oft die Verwendung des Mehles der getrockneten Blätter vorzuziehen. Die Trocknung soll rasch erfolgen, in 1—2 Tagen, in dünn ausgebreiteter Schicht bei Temperaturen von höchstens 40^0 und unter Vermeidung von Sonnenlicht.

Die enzymatische Wirksamkeit der geeignetsten Pflanzen leidet erst bei längerem Aufbewahren des getrockneten Blattmehles; drei Jahre alte Galeopsis- oder Heracleumblätter zeigten noch $^1/_4$ von der Wirksamkeit des frischen Vergleichsmateriales.

Zu kinetischen Versuchen ist als Chlorophyllase das Mehl der bei Zimmertemperatur getrockneten Blätter nach zuerst raschem, dann erschöpfendem Extrahieren des Chlorophylls mit $96^0/_0$igem Alkohol verwendet worden, mitunter auch einfach das Blattmehl ohne Vorbehandlung.

Die Menge des Enzyms bezeichnet Willstätter „mit dem Bruchteil des Pflanzenmehles, welches dem Chlorophyllgehalt des bei dem Versuche angewandten Extraktes entspricht“ (vergl. hierzu l. c. S. 179).

Besonders bemerkenswert ist der Umstand, dass Chlorophyllase noch in hochprozentigen Alkohollösungen und in Gegenwart von viel Azeton wirkungsfähig ist.

Dynamik.

Die Versuche haben ergeben, dass die Koeffizienten k der monomolekularen Reaktion mit zunehmender Zeit erheblich sinken. Dieser Abfall von k erklärt sich zunächst durch die allmähliche Schwächung des Enzyms und eines event. mitwirkenden Co-Enzyms. Ferner ist zu bemerken, dass die Chlorophyllase in einem heterogenen System in Wirksamkeit tritt, so dass die Diffusion von Substrat und Spaltprodukten den Gesamtverlauf der Reaktion beeinflusst. Willstätter führt folgende Beispiele an:

1. Hydrolyse.

Heracleum, Exsikkator-trocken, mit ganzer Enzymmenge in 66%igem Azeton bei 20°. Verfolgung der Hydrolyse kolorimetrisch (siehe S. 51).

Minuten	x	$k \cdot 10^4$
15	45	75,2
30	75	86,8
60	91	75,5
120	98	61,7

2. Äthanolyse (Fig. 4).

a) Heracleum in 92%igem Alkohol bei 25°; 500 ccm Extrakt, 1,8 g Chlorophyll enthaltend, mit 27,1 g Blattmehl angesetzt. Verfolgung der Alkoholyse durch die Phytolzahl Z (siehe S. 52).

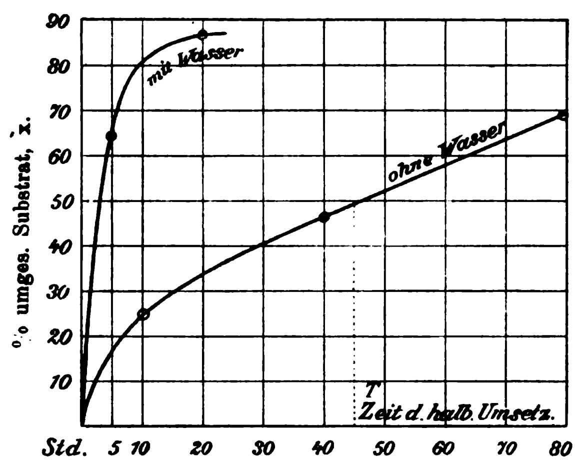


Fig. 4.

$Z_a = 31,5$

Stunden	Z_x	x	$k \cdot 10^4$
10	25,6	24,0	275
20	23,2	33,1	200
40	19,1	47,1	159
80	12,0	69,0	147

b) Einfluss des Zusatzes von Wasser (Fig. 4).

Heracleum in 80%igem Alkohol bei 25°. Anordnung und Methodik wie a.

$Z_a = 30,6$

Stunden	Z_x	x	$k \cdot 10^4$
5	12,9	65,1	2107
10	7,4	81,0	1661
20	5,1	86,4	998

Der Wasserzusatz ruft also, wie auch aus der Figur hervorgeht, eine starke Beschleunigung hervor.

Einfluss der Temperatur. Ein Temperaturoptimum der Äthanolyse wurde bei etwa 20° festgestellt.

Artspezifische Einflüsse. Bemerkenswert ist folgender Befund: „Die an Chlorophyllase armen Pflanzen geben Extrakte, die bei der Alkoholyse und Hydrolyse schlechter reagieren, als die zum Enzym gehörenden Extrakte. Dieselben Pflanzen geben extrahierte Blattmehle, welche mit den für die Reaktion geeignetsten Lösungen geringeren Umsatz bewirken als gutes Enzymmaterial."

Enzym und Substrat	Hydrolysegrad nach 60 Min.
Brennesselmehl mit Brennesselextrakt	10 %
„ „ Heracleumextrakt	23 %
Heracleummehl mit Brennesselextrakt	62 %
„ „ Heracleumextrakt	91 %

Synthesen. Besonders interessant ist die Durchführung der partiellen Chlorophyllsynthese durch Chlorophyllase nach der Gleichung

$$\underset{\text{Chlorophyllid}}{[C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2H)} + \underset{\text{Phytol}}{C_{20}H_{39}OH}$$
$$= \underset{\text{Chlorophyll}}{[C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2C_{20}H_{39})} + H_2O$$

Chlorophyllid a wurde mit Phytol in Lösung gebracht und mit etwas Mehl chlorophyllasereicher Blätter versetzt. An der Abnahme des sauren Anteiles, der aus ätherischer Lösung mit 0,02 n. KOH extrahiert wurde, konnte die Synthese des neutralen Esters verfolgt werden [1].

Ferner hat Willstätter mit der Chlorophyllase „den Schlüssel für die Beziehungen zwischen phytolhaltigem und phytolfreiem Chlorophyll gefunden". Willstätter und Hug [2]) haben aus isoliertem Chlorophyll mittels der Chlorophyllase das Äthylchlorophyllid („kristallisiertes Chlorophyll") erhalten:

$$[C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2C_{20}H_{39}) + C_2H_5OH =$$
$$= [C_{32}H_{30}ON_4Mg](CO_2CH_3)(CO_2C_2H_5) + C_{20}H_{39}OH.$$

Methoden.

1. Die Hydrolyse durch Chlorophyllase lässt sich mit einer von Willstätter angegebenen [3]) kolorimetrischen Methode bestimmen, die auf der

[1]) Willstätter u. Stoll, Untersuchungen über Chlorophyll (Monographie) S. 192.

[2]) Willstätter u. Hug, Lieb. Ann. 380, 210; 1911.

[3]) Willstätter u. Stoll, Monographie S. 179 u. ff.

sauren Natur der freien Chlorophyllide beruht; diese können nämlich aus der ätherischen Lösung mit verdünntem KOH ausgezogen werden; die alkalischen Auszüge werden mit Methylalkohol auf ein bestimmtes Volumen gebracht. In einer zweiten Probe wird das im Ather zurückgebliebene Chlorophyll mit methylalkoholischem Kali verseift und in gleicher Weise wie oben verdünnt. Die beiden Lösungen werden im Kolorimeter verglichen. Fehler ± 2 — 3 %.

2. Die Alkoholyse kann an dem schwerlöslichen Chlorophyllderivat, das aus der alkoholischen Lösung durch Einwirkung von Oxalsäure abgeschieden wird, ermittelt werden

a) durch Bestimmung der Phytolzahl, d. h. des Phytolgehaltes in Prozenten[1]). Diese geschieht durch Verseifung mit methylalkoholischer Kalilauge und darauffolgender 5—6 maliger Extraktion des Phytols mit Äther. Aus der mit Wasser gewaschenen, getrockneten, hierauf mit Tierkohle behandelten ätherischen Lösung wird unter besonderen Vorsichtsmassregeln der Äther abdestilliert, worauf das Phytol zur Wägung gebracht wird.

b) durch quantitative Abspaltung der Methyl- und Äthylgruppe mit Jodwasserstoff nach dem Verfahren von Zeisel.

Chlorophyll und Phäophytin enthalten ein Methoxyl und nehmen in alkoholischer Lösung unter Einwirkung der Chlorophyllase eine Äthoxylgruppe auf. Da in den teilweise umgewandelten Präparaten also sowohl Methoxyl- als Äthoxylgruppen vorhanden sind, ist es nicht zweckmässig, diese anzugeben, sondern Willstätter führt die „Jodsilberzahl" ein:

$$\text{Jodsilberzahl} = \frac{\text{gefundenes AgJ}}{\text{angewandte Substanz}} \cdot 100.$$

Aus den Jodsilberzahlen lässt sich die prozentische Menge umgewandelten Chlorophylls nach Formeln berechnen, welche Willstätter und Stoll[1]) angegeben und geprüft haben.

[1]) Willstätter, Hocheder u. Hug, Lieb. Ann. 371, 18, 1909 und 378, 81; 1910. — Monographie S. 308 u. 181

2. Kapitel.

Phosphatasen.

„Phosphatasen“ ist die regelrecht gebildete Bezeichnung für diejenigen Enzyme, welche organische Phosphate (Phosphorsäureester organischer Alkohole oder Alkoholderivate) spalten. Der Wirkungsbereich der verschiedenen Enzympräparate ist experimentell noch nicht genügend abgegrenzt, man muss also einstweilen die Wirkungen auf die einzelnen Phosphorsäureester getrennt behandeln. Die wichtigsten dieser Ester dürften die

Kohlehydratphosphorsäuren sein, deren Katalysatoren demgemäss zuerst besprochen werden. An die Derivate der eigentlichen Kohlenhydrate schliesst sich die

Glyzerinphosphorsäure als Bestandteil des Lecithins an.

Schliesslich spielt die

Inositphosphorsäure (Phytin) eine biochemische Rolle.

A. Kohlehydratphosphatasen.

Unter den Substraten der Kohlehydratphosphatasen haben wir zu unterscheiden

das Zymophosphat bzw. Fruktosediphosphat,
andere Zuckerphosphate, besonders Saccharosephosphat,
die Amylosephosphate.
die Nukleotide,

1. Die Zymophosphatase.

Das Vorkommen eines besonderen, den Fruktosediphosphorsäureester spaltenden Enzymes in der Hefe ist von Harden und Young[2]) entdeckt

---

[1]) Willstätter u. Stoll, Lieb. Ann. 378, 34; 1910. — Monographie S. 182.
[2]) Harden u. Young, Proc. Roy. Soc. 82, 327; 1910.

worden, nachdem Iwanoff[1]) gefunden hatte, dass Zymophosphat von Zymin vergoren wird.

Die Reaktion, welche durch die Zymophosphatase ausgelöst wird, muss nach Harden und Young folgendermassen formuliert werden:

$$C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2 + 2H_2O = C_6H_{12}O_6 + 2PO_4HR_2.$$

Auf die Rolle, welche dieses Enzym bei der alkoholischen Gärung spielt, kommen wir bei der Behandlung der Gärungsenzyme noch zurück.

Das Vorkommen der Zymophosphatase beschränkt sich nicht auf die Hefen[2]). Da sich die Hefenzymophosphatase aus dem Hefenpresssaft noch nicht hat isolieren lassen, so war es wünschenswert, ein anderes an Phosphatase reiches Material zu finden. Die ersten Versuche in dieser Hinsicht sind von Euler und Funke[3]) gemacht worden. Äusserst geringe Wirkung wurde erhalten mit:

10% Pepsin (Puriss. Merck), Pankreatin (Rhenania), Darmextrakt eines Kaninchens, defibriniertem Blut, Nierenmazeration von Kaninchen[3]).

Eine Fortsetzung dieser Versuche durch Euler, Thorin u. Johansson[4]) ergab einen stärker positiven Erfolg mit:

Darmschleimhaut von Schwein und Pferdenieren.

Die Versuche waren unter möglichst peinlicher Einhaltung aseptischer Bedingungen und unter Zusatz von Toluol ausgeführt. Beispiel:

25 ccm Extrakt von Pferdenieren und 25 ccm 5%ige Lösung des Natriumzymophosphats wurden gemischt und mit 0,5 ccm Toluol versetzt. Der Lösung wurden von Zeit zu Zeit Proben entnommen, welche die folgenden Zahlen ergaben:

Stunden	0	2	15	24	∞
in 10 ccm g $Mg_2P_2O_7$	0	0,0016	0,0054	0,0144	0,1321

Harding[5]) fand bald darauf autolysierten Ochsenpankreas fast wirkungslos gegenüber Zymophosphat. Erfolgreicher war eine Untersuchung von Plimmer[6]), welcher eine ziemlich weitgehende Spaltung durch Katzendarmextrakt erhielt, während Versuche mit Pankreas und Leber keine Spaltung ergaben. Plimmer hat seine verschiedenen Enzympräparate gleichzeitig auch an anderen Phosphaten geprüft. Seine zusammenfassende Tabelle wird hier vollständig mitgeteilt:

---

[1]) Iwanoff, Zblt. f. Bakt. 2, 24, 1; 1909.

[2]) Von anderen Mikroorganismen ist in bezug auf Zymophosphatase bis jetzt nur Bacterium coli untersucht worden. Diese Bakterien zeigten eine beträchtliche Spaltungsfähigkeit gegenüber Zymophosphat. Hans u. Beth Euler, H. 92, 292; 1914. Auch mit Aspergillus niger hat Verf. eine Spaltung erzielt.

[3]) Euler u. Funke, H. 77, 488; 1912.

[4]) Euler, Thorin, Johansson, H. 79, 375; 1912.

[5]) Harding, Proc. Roy. Soc. 85, 418; 1912.

[6]) Plimmer, Biochem. Jl 7, 43; 1913.

	Pankreas	Leber	Darm	Rizinussamen	Trockenhefe Zymin	Kleie
Hexose-(Zymo-)phosphat	0	...	+	+	+	+
Glyzerophosphat	0	...	+	+	+	+
Äthylphosphat	0	...	+	+	+	+
Diäthylphosphat	...	...	0	0	...	...
Phytin	0	0	0	+	0	+
Thymusnukleinat	0	...	+	...	+?	+
Weizennukleinat	...	...	+?	...	...	...
Fleischnukleinat	0	...	+	...	...	...
Hydroxymethylphosphat	0	...	0	0	+?	0
Phosphoprotein	²/₃	...	+	...	0	0

Zymophosphat wird also im Darm gespalten. Versuche mit Hunden haben gezeigt, dass das z. T. resorbierte Zymophosphat den Körper zum grössten Teil oder vollständig als anorganisches Phosphat verlässt[1]).

Ein Zymophosphat spaltendes Enzym wurde auch in höheren Pflanzen gefunden, zunächst von Euler und Kullberg[2]) in Hafer, dann von Harding (l. c.) in Rizinussamen und Mandelemulsin; von Plimmer (l. c.) in Kleie und von H. und B. Euler[3]) in Ahornblättern. In Gerstenkörnern beobachteten wir[3]) ein starkes Ansteigen der Phosphatasewirkung während der Keimung, und zwar bis zu einem nach etwa 4 Tagen eintretenden Maximum.

Die physikalischen und chemischen Einflüsse auf die Wirkung der Zymophosphatase müssen erst durch eingehendere Versuche sichergestellt werden

Der Umstand, dass Zymophosphat durch lebende Hefe nicht vergoren wird (Iwanoff, Harden und Young, Euler), während Trockenhefe und Hefepresssaft dazu imstande sind (Harden und Young[4])) ist um so auffallender, als einerseits nach Paine[5]) lebende Hefezellen für Natriumzymophosphat wenigstens teilweise permeabel sind, und andererseits Verf.[6]) die von Harden und Young[7]) bestätigte Beobachtung gemacht hat, dass die Zuckervergärung lebender Hefe durch Zymophosphat beschleunigt wird, ohne dass dieses selbst verbraucht wird.

Zymophosphatase scheint in ihrer Wirkung durch manche Antiseptika geschwächt zu werden.

Überschüssiges Phosphat beeinflusst stark den enzymatischen Phosphatumsatz[8]). Inwieweit bei den diesbezüglich bis jetzt vorliegenden Versuchen das Phosphat als Spaltprodukt der Hydrolyse dem weiteren Fortschreiten dieses Vorganges nach dem Massenwirkungsgesetz entgegenwirkt und inwie-

[1]) Euler, Thorin, Johansson, H. 79, 375; 1912.
[2]) Euler u. Kullberg, H. 74, 26; 1911.
[3]) H. u. B. Euler, H. 92, 294; 1914.
[4]) Harden u. Young, Proc. Roy. Soc. B 77, 405; 1906.
[5]) Paine, Proc. Roy. Soc. B 84, 289; 1911.
[6]) Euler u. Bäckström, H. 77, 394; 1912.
[7]) Harden, Alcoholic Fermentation, 2. Aufl., S. 130, 1914.
[8]) Harden u. Young, Proc. Roy. Soc. B 80, 299; 1908.

weit bei diesen Versuchen die sekundären Phosphate nur die Alkalinität der Reaktionslösung vergrössern, lässt sich noch nicht sagen, da über die Aziditätsbedingungen der Zymophosphatase noch keine quantitativen Messungen vorliegen.

Enzymatische Synthese von Zymophosphat. Phosphatese.

Nach den ausserordentlich interessanten Entdeckungen von Harden und Young über die Rolle der Phosphate bei der alkoholischen Gärung[1]) ist die Bildung des Zymophosphates, $C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2$ mit dem ganzen Gärvorgang eng verknüpft. Diese enzymatische Synthese in der Hefe wird demgemäss in Zusammenhang mit den übrigen an der alkoholischen Gärung beteiligten Vorgängen besprochen. An dieser Stelle sei nur folgendes hervorgehoben: Die einfachste Annahme könnte diejenige erscheinen, dass die genannte Synthese die Umkehrung derjenigen Reaktion ist, welche durch die Zymophosphatase beschleunigt wird, dass also auch die Synthese durch die Zymophosphatase katalysiert wird, wenn die geeigneten Reaktionsbedingungen vorhanden sind. Einer solchen Annahme schienen aber folgende Tatsachen entgegenzustehen:

Das spezifische Substrat der Zymophosphatase wird in Fruktose und Phosphorsäure gespalten und ist als Fruktosediphosphat anzusprechen. Als Ausgangsmaterial zur Bildung des Zymophosphates sind sämtliche Zymohexosen geeignet, aber die Bindung zwischen Glukose usw. an Phosphorsäure geschieht offenbar nicht direkt, sondern erst nach einer Umwandlung der Hexose. Der Katalysator der Synthese ist von der eigentlichen Zymase (im engeren Sinne) nur schwer abzuscheiden; vielleicht ist dies überhaupt nicht in allen Heferassen möglich; jedenfalls halten Harden und Young die enzymatische Synthese von Zymophosphat untrennbar mit der alkoholischen Gärung verknüpft, was die englischen Forscher durch die Gleichung zum Ausdruck bringen:

$$2\,C_6H_{12}O_6 + 2\,PO_4HR_2 = 2\,CO_2 + 2\,C_2H_5OH + 2\,H_2O + C_6H_{10}O_4(PO_4R_2)_2.$$

Aus der unterhalb 50° getrockneten Stockholmer Unterhefe H konnte ein Extrakt gewonnen werden, welcher die Fähigkeit besass, die Synthese zwischen vorbehandelter Glukose oder Fruktose zu vermitteln, welcher aber Zymophosphat nicht spaltete[2]). Diese Tatsache beweist, dass die Bildung von Zymophosphat keine einfache Umkehrung der Spaltung ist, sondern dass mit der enzymatischen Bindung der Phosphorsäure wenigstens noch eine andere Enzymwirkung, und zwar die Umwandlung der Hexosen, verknüpft sein muss.

Für den bei der Synthese des Zymophosphates wirksamen Stoff hat Verf. 1911 die Bezeichnung „Phosphatese" vorgeschlagen[3]). Es ist schon

[1]) Harden u. Young, Proc. Roy. Soc. B 77, 405; 1906.
[2]) Euler u. Kullberg, H. 74, 15; 1911.
[3]) Euler, H. 74, 13; 1911.

auf S. 3 betont worden, dass mit diesem Vorschlag über die Beziehung zwischen diesem Enzym und der „Zymophosphatase“ nichts ausgesagt werden soll[1]).

Man wird sich natürlich sofort fragen, wie sich die Annahme einer „Phosphatese“ und einer „Phosphatase“ mit dem Massenwirkungsgesetz vereinbaren lässt. Zunächst ist hierzu nochmals zu betonen, dass das Reaktionsprodukt der Spaltung nicht identisch ist mit dem Substrat der Synthese, selbst wenn Zymophosphat aus Fruktose hergestellt wird, denn dieses muss zunächst umgewandelt werden. Zweitens aber dürfte die Phosphatbindung keine einfache ideale Katalyse darstellen, sondern einen Teil einer gekoppelten Reaktion (vergl. Bd. I, S. 131). Leider ist die Verbrennungswärme des Zymophosphates noch nicht gemessen, so dass die Energiewandlung beim Phosphatumsatz noch unklar ist.

Zymophosphatbildung und -spaltung können auch in nächstem Zusammenhang zueinander stehen; besonders ist der Einfluss der Azidität auf die Zymophosphatbildung und -spaltung noch näher zu prüfen, ebenso die Mitwirkung des Hardenschen Co-Enzyms und nahestehender Aktivatoren auf den Phosphatumsatz.

Die Zymophosphatbildung erreicht nach neuen Messungen von F. Nordlund ihre grösste Wirksamkeit in ganz schwach saurer Lösung (pH = 6,5).

Zwischen 20° und 30° ist der Temperaturkoeffizient der Synthese 1,75 (Euler und Kullberg).

Die Wirksamkeit der aus Unterhefe H abgeschiedenen Phosphatese wird durch Erhitzen des Extraktes auf Temperaturen zwischen 30° und 40° in hohem Grade gesteigert[2]). Halbstündiges Erhitzen auf 60° vermindert die Reaktionsgeschwindigkeit auf etwa 1/9 ihres ursprünglichen Wertes.

Die grössten Unsicherheiten in bezug auf die Esterbildung liegen, wie schon 1911 betont wurde, darin, dass die Natur desjenigen Stoffes oder derjenigen Stoffe, welche mit dem Phosphat reagieren, noch unbekannt ist[3]).

Dass der Einfluss der Phosphate auf die alkoholische Gärung nicht nur ihrem Grade, sondern auch dem Sinne nach von der Azidität bezw. Alkalinität der Lösung abhängt, wurde zuerst von Euler und Tholin[4]) betont.

Methodik der Bestimmung organischer Phosphate s. S. 64.

[1]) Die Abscheidung der Phosphatese ist bis jetzt nur aus getrockneten Hefen gelungen. Es ist wohl möglich, dass in der lebenden Hefe die Phosphatese mit anderen Gärungsenzymen in der Weise verknüpft ist, wie es die Hardensche Gärungsgleichung fordert.

[2]) Euler u. Ohlsén, Biochem. Zs 37, 313; 1911.

[3]) Negative Resultate wurden von mir und Kullberg 1911 erhalten mit Inosit, Glyzerin, Mannit und Alanin. Die Anzeichen für eine Bindung von Arabinose (l. c. S. 22) haben sich später nicht bestätigt.

[4]) Euler u. Tholin, H. 97, 269; 1916.

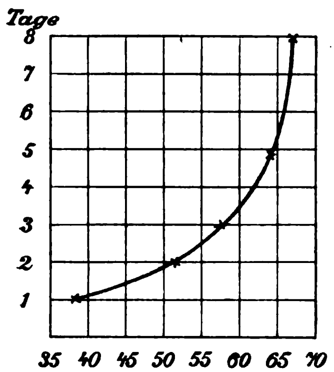
2. Saccharophosphatase.

Das Substrat dieses Enzyms sind die Salze der von Neuberg und Pollak[1]) dargestellten Saccharomonophosphorsäure, $C_{12}H_{21}O_{10} \cdot O \cdot PO_3R_2$ (Hesperonal-Calcium bezw. -Natrium, Merck). Durch Säuren wird auch dieser Phosphorsäureester nur langsam gespalten.

Die enzymatische Hydrolyse wird durch lebende Hefe oder, analog wie die des Zymophosphates, durch Hefenmazerationssaft bewirkt[2]); indessen bleibt es erst der späteren Forschung vorbehalten, zu entscheiden, ob wirklich neben der Zymophosphatase noch eine besondere Saccharophosphatase angenommen werden muss[3]).

Nach Djenab und Neuberg ist ihre Phosphatase sowohl in schwach essigsaurer Lösung als in neutraler und schwach alkalischer Lösung wirksam. Toluol schädigt nicht.

Folgender Versuch gibt eine Vorstellung vom zeitlichen Verlauf der Reaktion.



Abgespaltenes P_2O_5 in %.

Fig. 5.

20 g Na-Saccharophosphat (schwach alkalisch) in 400 ccm + 20 g Hefe OM + 20 ccm Toluol.

„Während in 10,0 ccm der Ausgangslösung (460,0 ccm) 0,0663 g Gesamt-P_2O_5 enthalten waren, ergab sich in je zwei gut übereinstimmenden Kontrollanalysen die Menge des abgespaltenen anorganischen Phosphats in 10,0 ccm Lösung:

Tage	P_2O_5	
1	0,0258 g	38,9 %
2	0,0344	51,9
3	0,0385	58,1
5	0,0428	64,6
8	0,0442	66,7
∞ ber.	0,0663	—

Zum Schluss sind rund ²/₃ des Saccharophosphats enzymatisch zerlegt worden, in gutem Einklang mit anderen Versuchsresultaten mit Oberhefe XII."

Die obigen Zahlen und die nebenstehende Figur zeigen, dass die Reaktion auch bei der verhältnismässig hohen Verdünnung des Substrates (5 %) nur bis zum Verbrauch von etwa ²/₃ des organischen Phosphates verläuft, was auffallend ist, da dieser Endzustand kaum dem natürlichen Gleichgewicht entspricht.

Auf die alkoholische Gärung der Saccharophosphate kommen wir bei der Besprechung der Gärungsreaktionen zurück.

---

[1]) Neuberg u. Pollak, Biochem. Zs 23, 515; 1910. 26, 514; 1910. — Chem. Ber. 43, 2060; 1910.

[2]) Djenab u. Neuberg, Biochem. Zs 82, 391; 1917.

[3]) Unterschiede hinsichtlich der Vergärbarkeit des Zymophosphats und des Saccharophosphats durch lebende Hefe können mit der verschiedenen Permeabilität der beiden Ester zusammenhängen; als zwingender Beweis für die Verschiedenheit der entsprechenden Phosphatasen kann die Vergärbarkeit der Saccharophosphate durch lebende Hefen kaum herangezogen werden.

Glukosidphosphorsäuren, wie sie von Neuberg und Pollak (l. c.) und, nach einem neueren Verfahren, von E. Fischer[1]) in grösserer Zahl dargestellt wurden, sind bis jetzt noch nicht enzymatisch untersucht worden.

3. Stärkephosphatasen.

Die im Malz vorkommenden organischen Phosphate werden durch die im gleichen Material befindlichen Phosphatasen gespalten[2]). Welche Bestandteile des Malzes hierbei die eigentlichen Substrate bilden, ist noch nicht vollständig bekannt; sicher ist nur, dass sich Phytin unter diesen Phosphaten befindet, und dass demgemäss die Phytase (siehe S. 63) an der enzymatischen Abspaltung von PO_4 aus Malz beteiligt ist. Nach den bemerkenswerten Untersuchungen von Samec[3]) enthält aber Stärke verschiedener Herkunft ein Phosphat eines höheren Kohlehydratrestes; möglicherweise ist dieses Phosphat der wesentliche Bestandteil des Amylopektins. Jedenfalls kommt dieses Substrat hier in Betracht und das entsprechende Enzym, das etwa als Amylo-Phosphatase zu bezeichnen wäre, verdient eine eingehendere Untersuchung.

Adler nimmt im Malz mindestens 2 Arten von Phosphatasen an, „von denen die eine unlösliche organische Phosphatkomplexe in Lösung bringt, während die andere anorganische Phosphate bildet".

Adler gibt ein Temperaturoptimum für die Phosphatasen bei 58° an.

„Die Phosphatasen sind ziemlich widerstandsfähig gegen eine Behandlung mit Alkohol in der Hitze. Zur Vernichtung der Enzyme wendet man am besten eine Abkochung mit etwa 85%igem Alkohol an."

„Die Enzyme, welche die löslichen Phosphate entstehen lassen, stellen praktisch nach 5 Stunden ihre Wirksamkeit ein; bei den die anorganischen Phosphate liefernden Enzymen tritt dies erst nach 14 Stunden ein." In einem Extrakt von 1 Teil Malz mit 20 Teilen Wasser findet der beste Abbau statt.

Die grösste Bedeutung kommt der Azidität zu. „Bei einem $pH = 5{,}4$ lässt sich die gesamte Phosphorsäure des Malzes in Lösung bringen, wovon etwa 93% anorganischer Natur sind. Gegen Hydroxylionen sind die Phosphatasen weit empfindlicher als gegen Wasserstoffionen. Bei stark saurer Reaktion geht aus dem Malz eine organische Phosphorverbindung in Lösung, das Phytin."

4. Nukleotidasen.

Die von Levene[4]) unter obigem Namen angenommenen, teilweise noch hypothetischen Enzyme sollen aus „Nukleotiden" Phosphorsäure abspalten, so dass die Verbindung von Kohlehydrat und Purin- oder Pyrimidinbase zurückbleibt. Nehmen wir als Beispiel für ein Nukleotid eines aus der bis jetzt am besten bekannten Gruppe der Ribose-Nukleotide, etwa Guanylsäure, so wäre der Vorgang also schematisch folgendermassen darzustellen:

$$\text{Phosphorsäure-Ribose-Guanin} \xrightarrow[\text{tidase}]{\text{Nukleo-}} \text{Phosphorsäure} + \text{Ribose-Guanin.}$$

---

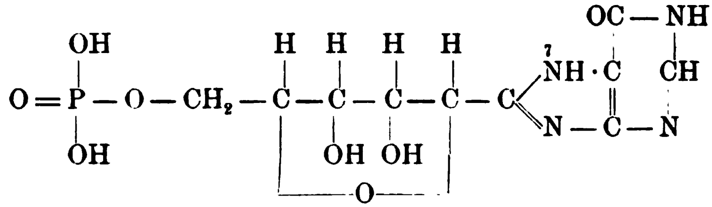
[1]) E. Fischer, Berl. Sitz.-Ber. 36, 905; 1914.

[2]) Adler, Biochem. Zs 70, 1; 1915.

[3]) Samec, Kolloidchem. Beih. 6, 32; 1914.

[4]) Levene und Medigreceanu, Jl Biol. Chem. 9, 65 und 389; 1911.

Die Stellung des Phosphatrestes in der Ribose ist bereits bei einem dieser Nukleotide bekannt, nämlich bei der Inosinsäure (Hypoxanthin-d-Ribosid-δ-Phosphorsäure, wo PO_4 am δ-Kohlenstoffatom sitzt[1]):



Unsicher ist noch, ob das Hypoxanthin an der Stelle 8 oder 7 mit der Ribose verbunden ist.

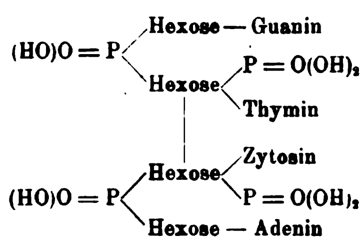
Die Phosphatgruppe wird aus der Inosinsäure verhältnismässig langsam abgespalten, die Inosinsäure ist also in dieser Hinsicht recht stabil, was vermutlich auch mit der Ribosephosphorsäure selbst der Fall ist[2]). Yamagawa hat verschiedene hierher gehörende Substanzen vergleichend mit 0,1 n · H_2SO_4 bei 100° hydrolysiert und folgende Zahlen für die Abspaltungsgeschwindigkeit der Phosphorsäure, ausgedrückt in monomolekularen Reaktionskonstanten, gefunden:

	$k \cdot 10^3$
Nukleinsäure	1800
Guanosinphosphorsäure	1770
Adenosinphosphorsäure	1660
Uridinphosphorsäure	480
Inosinsäure	470
Hexothymidindiphosphorsäure	726

In diesem Zusammenhang sei auf Messungen der Stabilität verschiedener Zuckerphosphorsäuren hingewiesen, welche Levene und Yamagawa[3]) ausgeführt haben.

Vorkommen. Nukleotidasen konnten Levene und Medigreceanu in Presssäften von Leber, Niere, im Blut und Blutserum nachweisen; besonders wurde der Darmsaft und der Auszug der Darmschleimhaut sehr wirksam befunden, Pankreasextrakt scheint nicht alle Nukleotide anzugreifen.

Ob die Nukleotidasen, welche die Phosphorsäure von Pyrimidinhexosiden, bzw. von der darin enthaltenen Hexose, abspalten, z. B. von Thymonukleinsäure



[1]) Levene und Jacobs, Biochem. Zs 28, 127; 1910. — Chem. Ber. 44, 746; 1911.
[2]) Yamagawa, Jl Biol. Chem. 43, 339; 1920.
[3]) Levene und Yamagawa, Jl Biol. Chem. 43, 323; 1920.

identisch sind mit denjenigen, welche Riboside angreifen, bleibt noch festzustellen.

Amberg und Jones[1]) bezeichnen das Enzym, welches Phosphorsäure aus Nukleinresten (Nukleotiden) abspaltet als „Phosphonuklease", während sie für die Enzyme, welche zur Abspaltung von Purinbasen führen, den Namen „Purinnukleasen" vorschlagen. Die Annahme von der unabhängigen Existenz der beiden erwähnten Enzyme gründen Amberg und Jones hauptsächlich darauf, dass die Hundeleber zwar Phosphorsäure aus der Nukleinsäure abspaltet, aber nicht Adenin. „Denn wäre letzteres der Fall, so müsste sich das so gebildete Adenin als Endprodukt auffinden lassen, da diese Drüse durchaus unfähig ist, Adenin irgendwie weiter zu ändern."

Wir kommen auf die Spaltung der Nukleinsäuren, besonders auf die Abspaltung der Basen bei der Behandlung der proteolytischen Enzyme wieder zurück.

B. Glyzerin-Phosphatase.

In der Natur kommt Glyzerinphosphorsäure als Spaltprodukt des Lezithins und anderer Phosphatide vor. Willstätter und Lüdecke[3]) haben zuerst gezeigt, dass die Glyzerinphosphorsäure des Lezithins optisch aktiv, und zwar linksdrehend, ist. Eine mit Willstätters Substanz vermutlich identische Glyzerinphosphorsäure haben Levene und Rolf[4]) aus Zephalin isoliert.

Die stark spaltende Wirkung einer lebenden Hefe auf das Natriumsalz der Glyzerinphosphorsäure ist zuerst von Neuberg und Karczag[5]) beschrieben worden.

4,3 g glyzerinphosphorsaures Na wurden mit 10 g Hefe XII des Berliner Inst. f. Gärungsgewerbe und 200 ccm Wasser angesetzt. Während 48 Stunden wurden bei 29° bei einem Versuch fast 50%, bei einem anderen 42% des Gesamtphosphors des zugesetzten Substrates in Freiheit gesetzt, während in Kontrollversuchen ohne Hefe nur eine spurenweise Spaltung erfolgte. Die Hefe allein lieferte bei den eingehaltenen Versuchsbedingungen nur etwa 4% des gefundenen anorganischen Phosphats.

Dieser Befund ist auch deshalb bemerkenswert, weil Na-Zymophosphat durch lebende Hefe — aus einer noch nicht aufgeklärten Ursache — nicht gespalten wird.

Grosser und Husler zeigten, dass Darmschleimhaut[6]) und Nierenzellen ein Enzym besitzen, das Glyzerinphosphatlösung vollständig spaltet, und dass ein solches Enzym in geringerer Menge auch in den Lungen ent-

[1]) Amberg u. Jones, H. 73, 407; 1911.
[2]) Siehe hierzu auch London u. Schittenhalm, H. 70, 10; 1910.
[3]) Willstätter u. Lüdecke, Chem. Ber. 37, 3753; 1904.
[4]) Levene u. Rolf, Jl Biol. Chem. 40, 1; 1919.
[5]) Neuberg u. Karczag, Biochem. Zs 36, 60; 1911.
[6]) Grosser u. Husler, Biochem. Zs 39, 1; 1913. Bestätigt von Plimmer, vergl. S. 55.

halten ist. Leber[1]) und Milz enthalten nur Spuren; Pankreas[1]), Muskel, Herzmuskel und Blut wurden mit negativem Ergebnis untersucht.

Die Spaltung durch die tierische Glyzerin-Phosphatase beschränkt sich nach den genannten Autoren nicht auf die natürliche, optisch-aktive Form, die durch Verseifung des Lezithins gewonnen wird, sondern soll auch vollständig bei Anwendung des synthetischen, inaktiven Substrates verlaufen. Ob dies bei allen Aziditäten der Fall ist, bleibt zu untersuchen.

Plimmer (vergl. S. 55) erhielt Glyzerinphosphat-Hydrolyse auch mit Trockenhefe, Rizinussamen und mit Kleie.

Aus der Tatsache, dass aus Darm, Niere und Lunge ein Glyzerinphosphat spaltendes Enzym erhalten wird, nicht aber aus Pankreas und Leber, schliesst er, dass die Phosphatase nicht mit Lipase bzw. den Esterasen der ersteren Organe identisch ist. Er hebt in dieser Hinsicht ferner hervor, dass das Enzym der Phosphatspaltung, das sich in Rizinussamen findet, durch Wasser extrahiert werden kann, während die Rizinuslipase in Wasser unlöslich ist.

Falk und Sugiura[2]) fanden allerdings in Rizinussamen eine wasserlösliche Esterase, welche mit der Glyzerinphosphatase möglicherweise identisch ist. Falk[3]) hat dieses Enzym näher untersucht. Er fällt die filtrierten und dialysierten wässerigen Auszüge mit Azeton. Der Aschegehalt der Substanz betrug 5%.

Das Präparat enthielt, aschefrei und trocken, 15,4—16,3% N und 0,36 bis 0,9% P. Die Substanz gab keine Reaktion auf Kohlehydrate, enthielt viel Tryptophan, viel aromatische Gruppen und Spur von Tyrosin.

Falk hält das Enzym für ein Protein.

Němec[4]) untersuchte die Samen folgender höherer Pflanzen hinsichtlich ihrer Fähigkeit Glyzerinphosphorsäure zu spalten. Der folgende Auszug aus seiner Tabelle enthält die Menge P_2O_5 in %, welche mit 5 g Samen während 48 Stunden bei 25° aus Glyzerinphosphorsäure abgespalten werden.

Hordeum distichum	1,07	Lens esculenta	28,62
Secale cereale	1,15	Polygonum fagopyrum	28,66
Avena sativa	1,16	Helianthus annuus	29,19
Lupinus angustifolius	4,62	Pisum sativum	30,45
Zea Mays	14,73	Ricinus communis	31,69
Vicia Faba	16,69	Linum usitatissimum	32,32
Picea excelsa	17,50	Brassica napus	33,57
Prunus communis	22,23	Raphanus sativus	34,19
Cannabis sativa	23,74	Sinapis alba	41,34
Papaver somniferum	26,56	Glycine hispida	49,97

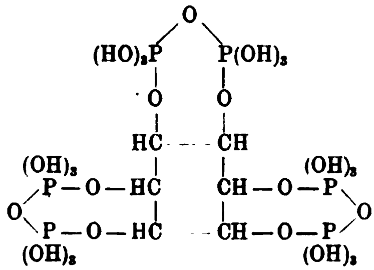
Dass die Spaltungsgrenze 50% nie überschritten wird, dürfte darauf hindeuten, dass aus der synthetischen, also razemischen Glyzerinphosphorsäure

[1]) Grosser u. Husler, Biochem. Zs 39, 1; 1913. Bestätigt von Plimmer, vergl. S. 55.
[2]) Falk und Sugiura, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 217; 1915.
[3]) Falk, Proc. Nat. Acad. of Science, Boston, 1, 136; 1915.
[4]) Němec, Biochem. Zs 93, 94; 1918.

nur die natürlich vorkommende Form angegriffen wird, was besonders in Rücksicht auf Grossers und Huslers Ergebnisse noch näherer Untersuchung bedarf.

C. Phytase.

Substrat. Das Phytin ist nunmehr als Inositphosphorsäure erkannt[1]), und zwar kommen nach den Analysen 6 PO_4-gruppen auf 1 Molekül Inosit, $C_6H_{12}O_6$, wonach also dem Phytin etwa die folgende Formel zukommt (Neuberg):



Bemerkenswert ist, dass die Phosphorsäure aus dem Phytin verhältnismässig leicht abgespalten wird[2]).

Über die Art der Bindung der Phosphorsäure und die Stellen der freien Hydroxylgruppen herrscht noch nicht völlige Klarheit. Die weite Verbreitung des Phytins im Pflanzenreich ist durch die Arbeiten von Suzuki und Yoshimura sowie von Schulze und Winterstein erkannt worden.

Dass das Phytin in den Pflanzen von einer spezifischen Phosphatase begleitet wird, haben zuerst Suzuki, Yoshimura und Takaishi[3]) angegeben, welche für dieses Enzym den Namen Phytase vorgeschlagen haben[4]). Sie konnten bei der enzymatischen Spaltung neben Phosphorsäure auch Inosit nachweisen.

In Aspergillus niger und anderen Schimmelpilzen wurde Phytase von Dox[5]) nachgewiesen.

Im Gegensatz zu Plimmer konnten Mac Collum und Hart[6]) Phytin durch Auszüge aus tierischen Organen (Leber und Blut, nicht Niere und Muskel) spalten.

Vorkommen. Die oben genannten japanischen Forscher haben die Phytase aus Reiskleie gewonnen. Sie ist, wie man jetzt weiss, in zahlreichen Pflanzensamen (siehe auch Plimmer, S. 55) enthalten und kann z. B. aus Grünmalz leicht dargestellt werden.

---

[1]) Suzuki, Yoshimura, Bull. Coll. Agric. Tokyo, 7, 495; 1907. Neuberg, Biochem. Zs 5, 443; 1907 und 9, 557; 1908. — Posternak, C. r. 169, 79; 1919.

[2]) Siehe hierzu Jegorow, Biochem. Zs 42, 432; 1912 und 61, 41; 1914.

[3]) Suzuki, Yoshimura u. Takaishi, Bull. Coll. Agric. Tokyo, 7, 504; 1907.

[4]) Zaleski, Bot. Ber. 24, 285; 1906 hatte bereits darauf hingewiesen, dass aus löslichen Phosphorverbindungen in keimenden Samen Phosphorsäure freigemacht wird.

[5]) Dox, Jl Biol. Chem. 10, 183; 1911.

[6]) Mac Collum u. Hart, Jl Biol. Chem. 4. 497; 1908.

Darstellung. Suzuki und seine Mitarbeiter haben ihre Reiskleienphytase mittels Alkohol gefällt. Adler[1]) beschreibt seine Darstellungsmethode aus Grünmalz eingehender:

Das 14 Tage gekeimte Grünmalz wird gequetscht, 700 g davon werden 7 Stunden lang mit 2,5 l 25%igen Alkohols extrahiert. Der von den festen Rückständen abfiltrierte Extrakt wird nun mit dem 3½fachen Volumen 96%igen Alkohols versetzt; der hierdurch entstehende flockige Niederschlag setzt sich in 3 Stunden ab; er wird durch Filtration von der Flüssigkeit getrennt und dann mit Alkohol und Äther gewaschen.

Die Darstellungsweise ist also ganz ähnlich der von Lintner für Amylase angegebenen.

Optimale Azidität: Adler (l. c.) fand pH = 5,4—5,5.

Temperatur: Adler gibt als günstigste Temperatur für die Phytasewirkung 56° an.

Spaltungsgrenze: Unter den optimalen Bedingungen konnte Adler bis zu 72% des angewandten Phytins zerlegen.

Analytische Methoden: Die Bestimmung des Phytins haben besonders Plimmer und Heubner eingehend bearbeitet (siehe unten).

D. Methoden zur Bestimmung der organischen Phosphate.

In erster Linie kommen die Molybdatmethode und die Fällung mit Magnesiamischung in Betracht. Auch die Urantitration nach Neubauer kann, wenn keine grosse Genauigkeit erforderlich ist, verwendet werden.

Eine auch zur Bestimmung von PO_4 in organischen Phosphaten vielfach brauchbare Methode hat Neumann angegeben[2]). Für die Untersuchung von Phytin ist eine Modifikation erforderlich (Plimmer und Bayliss[3]); Heubner[4])).

Zur Verfolgung der enzymatischen Spaltung muss anorganisches Phosphat neben den verschiedenen organischen Phosphaten bestimmt werden. Letztere verhalten sich hinsichtlich der beiden hauptsächlichen Fällungsmittel (Magnesiamischung und Ammoniummolybdat) verschieden.

Während es nach Vorbrodt[5]), Plimmer und Page[6]) u. a. notwendig ist, bei Arbeiten mit Phytinlösungen die Molybdänmethode (bei 37°) zu verwenden (nach Heubner l. c. kann dies ohne Störung nur bei Anwesenheit geringer Phytinmengen geschehen), kann man anorganisches Phosphat von Kasein[8]) von Glycerophosphat und von Zymophosphat durch Magnesiamischung trennen, und zwar unter Vermeidung höherer Temperaturen.

[1]) Adler, Biochem. Zs 75, 319; 1916. — Siehe auch Seite 59.
[2]) Neumann, H. 37, 115; 1903. — 43, 32; 1905.
[3]) Plimmer u. Bayliss, Jl Physiol. 33, 439; 1906.
[4]) Heubner, Biochem. Zs 64, 401; 1914.
[5]) Vorbrodt, Bull. Acad. Cracovie, A, 418; 1910.
[6]) Plimmer u. Page, Biochem. Jl 7, 163; 1913.

Jedenfalls ist stets die Zersetzlichkeit desjenigen organischen Phosphats, mit welchem man arbeitet, genau in Betracht zu ziehen.

Mikro-Methoden zur Bestimmung von PO_4 sind 1919 von Kleinmann[1]) angegeben und eingehend besprochen worden, und zwar eine kolorimetrische, eine sedimetrische und eine nephelometrische.

Das Prinzip der Kleinmannschen Bestimmung der Phosphorsäure als Alkaloidphosphomolybdat ist neuerdings von Embden[2]) mit Erfolg zu einer gravimetrischen Mikromethode ausgearbeitet worden.

Die Mikromethode von Svanberg, Zimmerlund und Sjöberg[3]) beruht darauf, dass das Ammoniak des Ammoniumphosphomolybdats nach einer der gebräuchlichen Mikro-Kjeldahl-Methoden bestimmt wird. Phosphormengen von 0,05—1,00 mg P lassen sich nach dieser Methode auf etwa 3 % genau ermitteln.

Siehe auch: Pregl, Die quantitative organische Mikroanalyse. Berlin 1917. S. 183.

[1]) Kleinmann, Biochem. Zs 99, 19 u. ff.; 1919.
[2]) Embden, H. 113, 138; 1921.
[3]) Svanberg, Zimmerlund u. Sjöberg, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi Bd. 8; 1921.

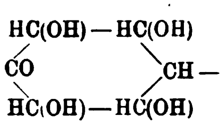
3. Kapitel.

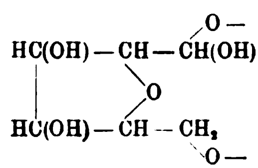
Zellulase und Hemizellulasen. Inulinase und Pektinasen.

A. Zellulase.

Obwohl die Zersetzung des Holzes durch Pilze und Mikroorganismen vielfach studiert worden ist, sind enzymologisch brauchbare Ergebnisse erst in letzter Zeit gewonnen worden. Dies lag zum Teil daran, dass meist Substrate gewählt worden waren, welche zwar für das Wachstum der untersuchten Organismen einen günstigen Nährboden lieferten, aber chemisch wenig definiert waren; es stand also nicht fest, welcher ihrer Bestandteile tatsächlich die biochemische Zersetzung erfahren hatte, wenn eine solche nachgewiesen werden konnte. Die Verwendung von reiner Zellulose (Filtrierpapier) als Substrat bei den Versuchen von van Iterson[1]) mit holzzerstörenden Schimmelpilzen hat demgemäss schon einen erheblichen Fortschritt gebracht. Der Nachweis einer eigentlichen „Zellulase", also eines die Zellulose hydrolytisch spaltenden Enzyms wurde ferner dadurch erschwert, dass die Mikroorganismen, welche die Zellulose spalten, sofort über diese erste Stufe des Angriffes hinausgehen und die Spaltprodukte unter Hydrolyse, Veratmung oder Vergärung weiter verbrauchen.

Substrat. Die Zellulose, $(C_6H_{10}O_5)_n$, ist nur ihrer Elementarzusammensetzung nach bekannt, während die Ermittelung ihrer Konstitution und Konfiguration noch nicht gelungen ist. Die bezüglich ihres Baues wichtigste Tatsache ist wohl die, dass die Hydrolyse mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure Zellobiose[2]) liefert, wodurch ein wesentlicher Unterschied gegenüber der Stärke festgestellt ist. Von den meisten Zellulose-Chemikern werden ringförmige Bindungen im Molekül angenommen, sei es, wie von Gross und Bevan, Zyklo-Ketohexangruppen (I) oder, wie von Green, kombinierte Oxyfuranringe (II).

(I) 

 (II).

[1]) C. van Iterson jr., Versl. K. Akad. v. Wetensch. Amsterdam 11, 807; 1903. — Zbt. f. Bakt. II, 11, 689; 1904.

[2]) Siehe hierzu im 6. Kapitel den Abschn. Zellobiase, ferner Karrer u. Widmer, Helv. 4, 174 und 295; 1921.

Was die nicht enzymatische Spaltung betrifft, so sind verdünnte Mineralsäuren bei gewöhnlichem Druck nur wenig wirksam, bei höherem Druck und höherer Temperatur wird der abgespaltene Zucker gleichzeitig zerstört, weshalb auch die Verzuckerung mit verdünnten Säuren noch nicht zu technisch günstigen Resultaten geführt hat.

Durch konz. Schwefelsäure, und, nach Willstätters technisch wichtiger Entdeckung, durch 41%ige Salzsäure wird Zellulose gelöst. Eine Lösung der Zellulose wird bekanntlich auch durch das 1857 von Schweizer angegebene Reagens — Kupferhydroxyd in konz. Ammoniak — erreicht, wobei sich in Gegenwart von Alkali Kupferalkalizellulose bildet. Die Veränderungen, welche die Zellulose hierbei erleidet, sind noch nicht näher bekannt. Mit kalter Kalilauge entsteht — unter starker Quellung — Kaliumzellulosat.

Vorkommen. Durch die neueren, sehr wertvollen Untersuchungen von H. Pringsheim[1]) haben wir über die Existenz einer wirklichen Zellulase in Bakterien positive Kenntnisse gewonnen.

Auch manche Schimmelpilze scheinen echte Zellulase zu enthalten.

Bezüglich der holzzerstörenden höheren Pilze ist ein Nachweis von gleicher Schärfe bis jetzt nicht erbracht worden.

1. Bakterien-Zellulase.

Wie erwähnt, hat Pringsheim[1]) in Bakterien, und zwar in denitrifizierenden, zelluloseangreifenden Bakterien, welche nach den Angaben van Itersons kultiviert waren, ein Enzym gefunden, welches echte Zellulose unter Bildung von Zellobiose hydrolytisch spaltet.

Der Nachweis, dass bei den untersuchten Bakterien eine hydrolytische Spaltung der Zellulose eintritt, gelang Pringsheim dadurch, dass er vermittels eines geeigneten Antiseptikums (Jodoform) zu den Bakterienkulturen ohne Beeinflussung des hydrolytischen Abbaues der Zellulose das Gärferment unterdrückte; in Gegenwart von Jodoform entgingen die hydrolytischen Produkte, Zellobiose und Glukose, den Gärungsspaltungen. Wie gleich erwähnt sei, konnte auch die Wirkung der Zellobiase, durch welche die Glukose entsteht, eliminiert werden; bei 67° nämlich, also nahe am Tötungspunkt der Zellulase, wurde bei gleichzeitiger Unterdrückung des Gärfermentes durch das Antiseptikum auch die Zellobiase ausser Tätigkeit gesetzt. Bei dieser Temperatur gelang es, den Zelluloseabbau so zu leiten, dass als einziges Hydrolyseprodukt Zellobiose erhalten wurde. Auch konnte festgestellt werden, dass durch die untersuchten Mikroorganismen eine restlose Lösung des Polysaccharids erreicht werden kann.

Die Bakterienzellulase ist nach Pringsheim ein Endoenzym, das nur auf Grund des Reizes, den die Zellulose auf die Zelle ausübt, abgeschieden wird; sie scheint in Wasser unlöslich zu sein.

[1]) H. Pringsheim, H. 78, 266; 1912.

Bei 20° „ging hingegen die Hydrolyse der Zellulose teilweise über die Zellobiose hinaus, und als Hauptprodukt wurde Glukose gefasst".

Extrahierbarkeit der Cellulase. Da die Zellulose nicht in die Bakterienzellen eindringen kann, muss die Zellulase von den Zellen abgeschieden werden, um auf das Substrat wirken zu können. „Damit ist aber noch nicht entschieden, ob das Ferment in wasserlöslicher Form in die Nährlösung gelangt und hier auf die Zellulose wirkt, oder ob es von den Zersetzern der Zellulose nur auf Grund eines Reizes ausgeschieden wird, welcher von dem Polysaccharid auf seine Verzehrer ausgeübt wird." Mit Recht entscheidet sich Pringsheim für die Auffassung, dass die Zellulase (der Bakterien) ein Enzym ist, das nur auf Grund des Reizes, den die Zellulose auf die Zelle ausübt, abgeschieden wird.

Antiseptika. Die Aufgabe, durch geeignete Wahl von Paralysatoren die Zellulase allein zur Wirkung kommen zu lassen und also die Gärungsenzyme und womöglich auch die Zellobiase zu unterdrücken, konnte bei der hohen Temperatur der energischen thermophilen Zellulosegärung durch Toluol, ein zuerst von Vandevelde[1]) in Vorschlag gebrachtes Mittel, nicht gelöst werden; dagegen erwies sich Jodoform als brauchbar, und zwar wurde es so verwendet, dass man für 2 l Gärflüssigkeit etwa 1 g in 50 ccm Azeton löste und diese Lösung in die gärende Zellulosekultur unter Schütteln eingoss.

Zellulosegärung.

Die Spaltung der Zellulose durch Mikroorganismen beginnt zweifellos mit Hydrolysen zu Biosen und Hexosen, welch letztere der eigentlichen Gärung unterliegen. Die hier in Betracht kommenden Gärungserreger teilt man nach einem von Barthel aufgestellten Schema zunächst in anaerobe und aerobe ein[2]). Man kann drei anaerobe Gärungen unterscheiden, nämlich: Wasserstoffgärung, Methangärung und Denitrifikationsgärung, welche sämtliche von Bakterien, und zwar von drei verschiedenen Gruppen bewirkt werden.

Nicht weniger wichtig als die anaerobe ist die aerobe Zellulosegärung, welche

a) durch Bakterien, und zwar in neutraler und alkalischer Lösung,
b) durch Schimmelpilze, und zwar in saurer Lösung

durchgeführt wird. Leider ist in chemischer Hinsicht über die aerobe Gärung noch wenig bekannt.

Anaerobe Gärung durch Bakterien. Nachdem van Tieghem und Hoppe-Seyler (1886) bemerkenswerte Versuche über die Zellulosegärung

[1]) Vandevelde, Biochem. Zs 3, 318; 1907.
[2]) Methodisches siehe bei C. A. G. Charpentier, Diss. Helsingfors 1921.

durch Bakterien angestellt hatten, schuf Omelianski in einer Reihe eingehender Untersuchungen die festen bakteriologischen Grundlagen für die Zellulosegärung durch anaerobe Bakterien. Er stellte fest, dass man zwischen Wasserstoffgärung und Methangärung der Zellulose unterscheiden muss, und dass jeder der beiden Vorgänge durch einen besonderen Mikroben ausgelöst wird. Für die beiden Gärungen gibt er folgende Bilanzen an:

Wasserstoffgärung:		Gärprodukte:	
Zum Versuch verwendet .	3,4743 g	Fettsäuren	2,2402 g
Unzersetzt geblieben . .	0,1272 g	Kohlensäure	0,9722 g
Durch Gärung verschwund.	3,3471 g	Wasserstoff	0,0138 g
		Zusammen	3,2262 g

Methangärung:		Gärprodukte:	
Zum Versuch verwendet .	2,0815 g	Fettsäuren	1,0223 g
Unzersetzt geblieben . .	0,0750 g	Kohlensäure	0,8678 g
Durch Gärung verschwund.	2,0065 g	Methan	0,1372 g
		Zusammen	2,0273 g

Ich verweise im übrigen auf die zusammenfassende Darstellung Omelianskis in Lafars Handbuch III, 245, 1904 und eine spätere Arbeit dieses Forschers in Zbt. Bakt. II 36, 472; 1913[1]).

Pringsheim hat die Bildung von Glukose sowohl bei der Methangärung als bei der Wasserstoffgärung nachgewiesen[2]).

13 g schon einmal zu einer Methangärung verwandter Zellulose wurden zusammen mit 5 g $CaCO_3$ in 4 Liter Leitungswasser, das 4 g $(NH_4)_2SO_4$, ferner 0,6 g K_2HPO_4 und 0,1 g $MgSO_4 + 7 H_2O$ enthielt, aufgeschwemmt und mit einer in starker Gärung befindlichen Kultur beimpft. Nach 4 Tagen war die Gärung stark im Gange. Es wurde, immer bei 37°, Toluol zugegeben. Nach 7 Tagen war noch keine Reduktion der Nährflüssigkeit bemerkbar, am 10. Tage trat sie ein. Aus dieser Lösung wurde nun nach Zusatz von Phenylhydrazin das Glukosazon isoliert. Neben diesem war noch ein in Wasser lösliches Osazon erhalten worden.

In analoger Weise verlief der Nachweis der Glukose nach der Wasserstoffgärung.

Nach der Einwirkung thermophiler Bakterien (kultiviert nach den Angaben von McFayen und Blaxall[3])) konnte Pringsheim nicht nur Glukose sondern auch Zellobiose nachweisen[4]).

Das gleiche Ergebnis wurde mit Sicherheit erzielt bei Versuchen mit denitrifizierenden Bakterien.

Pringsheim leitete in Anlehnung an van Itersons Vorschlag eine denitrifizierende Zellulosezersetzung ein, indem er 2% Filtrierpapier in Leitungswasser unter Zusatz von

[1]) Siehe ferner McBeth und Scales, U. S. Dept. of Agr. Bur. of Plant Industry. Bull. 226. Ref. Zbt. Bakt. II 39, 167; 1913.

[2]) Über die Produkte der Zellulosegärung durch thermophile Bakterien siehe Pringsheim, Zbt. Bakt II, 38, 513; 1913, ferner Hutchinson und Clayton, Jl Agric. Soc. Cambridge 1919, 143.

[3]) McFayen und Blaxall, Trans. Jenner Inst. Prev. Med. (2) 1899, 182 (zitiert nach Pringsheim).

[4]) Über die weite Verbreitung thermophiler (Optimum 60°—65°) zelluloseangreifender Bakterien in Mistbeeterde u. dergl. siehe Kroulik, Zbt. Bakt. II, 36, 339; 1912.

0,05 % KNO_3 und 0,01 % K_2HPO_4 aufschwemmte, eine Stöpselflasche mit der Nährlösung vollfüllte und mit Grabenmoder beimpfte. „Inkubiert man bei 37°, so setzt im Laufe einer Woche energische Stickstoffbildung ein, durch die das Papier in die Höhe getrieben wird.“ Zur Verstärkung der Gärung erneuert man nun mehrmals die Nährflüssigkeit; das Papier wird durch die mehrfache Behandlung mit den denitrifizierenden Bakterien gewissermassen angeätzt; nun geht bei Zusatz des Jodoforms die Bildung der Hydrolyseprodukte weiter, während die Gärung unterdrückt wird. Der Nachweis der Glukose und der Zellobiose ist im Original, S. 283 u. ff., nachzusehen.

Bekanntlich ist die Verwertbarkeit des Holz- und Strohstoffs als Pferde-, Rinder- und Schweinefutter in den letzten 5 Jahren, besonders durch N. Zuntz und seine Mitarbeiter vielfach untersucht worden. Dabei hat sich der frühere Befund[1]) bestätigt, dass zellulosespaltende Enzyme ebensowenig im Verdauungstraktus dieser Tiere wie in dem des Menschen sezerniert werden, sondern dass Zellulose von den untersuchten Tieren dadurch „verdaut“ wird, dass ihre Bakterienflora Zellulosegärung hervorzurufen imstande ist. Die einleitenden Hydrolysen, welche zunächst zu Dextrinen, Zellobiose und Glukose führen müssen, sind allerdings hierbei noch nicht untersucht worden; Endprodukte dieser Zellulosegärungen sind CO_2 und Methan, ferner noch fette Säuren, besonders Buttersäure[2]) (neben etwas Ameisensäure, Essigsäure und Milchsäure), also Produkte, welche aus der Glukose entstanden sein dürften. Inwieweit die durch Hydrolyse gebildeten Zuckerarten und die durch Gärung entstehenden nicht gasförmigen Produkte vom Darm resorbiert werden, bleibt noch zu untersuchen. Was die bakterielle Bildung von brennbaren Gasen aus zellulosehaltigem Material betrifft, so kann dieser Teil der Gärungsreaktion vom tierischen Organismus höchstens durch die Aufnahme der Gärungswärme ausgenützt werden; die damit zusammenhängenden energetischen Fragen sind bis jetzt noch verhältnismässig wenig besprochen worden.

Im Darmkanal des Menschen wird, wie durch Untersuchungen von J. E. Johansson[3]) festgestellt ist, die Zellulose nicht angegriffen oder verwertet. Ob hierzu die Bakterienflora des menschlichen Darmkanals überhaupt ungeeignet ist, oder die Einwirkungszeit zu kurz ist, um merkbare Veränderungen hervorzubringen, ist noch nicht entschieden.

2. Zellulase der Pilze.

Niedere Pilze.

Von älteren Arbeiten seien hier folgende angeführt:

Newcombe[4]) beschreibt in einer Arbeit über Cellulose-Enzyme ein Enzym aus Aspergillus Oryzae, das Zellulose angreift. Wehmer[5]) beobachtete

[1]) Siehe besonders Scheunert, H. 48, 9; 1908. — Ältere Versuche über Zellulose-Verdauung im menschlichen und tierischen Organismus, besonders beim Hund, findet man in den Arbeiten von Lohrisch, H. 47; 1906 und 69, 143; 1910.

[2]) Siehe hierzu Krogh und Schmit-Jensen, Biochem. Jl 14. 686; 1920.

[3]) J. E. Johansson, Sv. Läkaresällsk. Förhandl. 1918, 218.

[4]) Newcombe, Ann. of Bot. 13, 49; 1899.

[5]) Wehmer, Zbt. Bakt. II, 2, 140; 1896.

eine Einwirkung auf Zellulose durch Aspergillus Wentii und Went[1]) durch Monilia sitophila.

Hoppfe[2]) gibt an, aus dem Pansen des Rindes einen „Aspergillus cellulosae" gezüchtet zu haben, welcher durch sein Wachstumsoptimum bei 35°—37° charakterisiert ist und beim Wachstum echte Zellulose (Filtrierpapier) aufzehren soll; er ist von Ellenberger[3]) eingehender untersucht worden. Nach seinen Angaben wurde die Zellulase dieses Pilzes in folgender Weise zur Wirkung gebracht:

Man brachte in sterile Kölbchen die betr. Nährlösung mit Filtrierpapier, das mit Chloroformdampf sterilisiert war und setzte Pilzsporen zu. Nach 8 Wochen war unter der inzwischen gebildeten sporenhaltigen Myzel-Faserdecke eine breiige, faserige Masse entstanden. Diese Sporen, Myzelien, Hyphen und Zellulosefasern enthaltende Flüssigkeit wurde durch ein Berkefeld-Filter gesaugt. Die filtrierte Flüssigkeit erwies sich keimfrei. Dies keimfreie Filtrat wurde in je 3 sterilen Reagenzgläsern verteilt mit Zusatz von Filtrierpapierstreifen. Zum Schutz gegen Eindringen von Luftkeimen wurde 1 ccm Toluol auf die Oberfläche der Flüssigkeit gebracht. Nach 14 Tagen (Temp. 22°) sah man Auffaserung des Papiers, nach weiteren 14 Tagen war das Papier so zerfallen, dass beim Schütteln ein Brei entstand. Irgend ein Pilzwachstum war nicht zu beobachten, auch nach Beimpfen von 3 Platten Mannitagar trat kein Wachstum ein.

Ob die Entstehung des Faserbreies von einer Enzymwirkung herrührt, lässt sich aus der Mitteilung nicht beurteilen.

In Versuchen, bei welchen der lebende Pilz zugegen war, soll in 10 Tagen etwa 5% der anwesenden Zellulose in Lösung gegangen sein; bei diesen Versuchen wurde auf Spaltprodukte mit Fehlingscher Lösung usw. geprüft; Zucker wurde aber leider nicht zu isolieren versucht.

In Penicillium glaucum fand Heller[4]) wenig, in Mucor mucedo keine Zellulase.

Höhere Pilze.

Bemerkenswerte Resultate hat C. van Iterson jr.[5]) mit nicht näher bestimmten Holz zerstörenden Pilzen erhalten, die zur Gruppe der Hyphomyzeten gehören. Wurden die auf Papier gewachsenen Pilze durch kräftiges Schütteln mit Toluol abgetötet, so erlangte die Nährlösung die Fähigkeit, Fehlingsche Lösung zu reduzieren, und Glukose konnte als Osazon nachgewiesen werden. Ein die Zellulose spaltender Presssaft wurde allerdings aus diesen Pilzen nicht gewonnen.

Eine spezifische Fähigkeit zur Lösung der Zellulose fand F. Heller (l. c.) bei 11 Fusarium-Arten, ferner bei Rhizoctonia solani und Trichothecium roseum; nach dem gleichen Verfasser wird durch Pilze vom Typus des Fusarium Lolii echte Zellulose angegriffen, während Hemizellulosen intakt bleiben.

---

[1]) Went, Jahrb. wiss. Bot. 36, 611; 1901.

[2]) Hoppfe, Zbt. Bakt. 83, 531; 1919.

[3]) Ellenberger, H. 96, 236; 1915.

[4]) Heller, Dissert. Rostock, 1917.

[5]) van Iterson jr., Verslagen der Kon. Akademie van Wetensch. Amsterdam 9, 807; 1903. — Zbt. Bakt. II, 11, 689; 1904.

Bereits früher hatte Kohnstamm angegeben, das Presssaft des Hausschwammes, Merulius lacrimans, auf Blättern von Elodea ähnliche Korrosionen hervorruft, wie der lebende Pilz. Dass aber diese Einwirkung auf die beginnende Spaltung einer echten Zellulose zurückzuführen ist, halte ich, in Übereinstimmung mit Pringsheim, für recht zweifelhaft.

Durch Behandeln der Zellulose mit 70-prozentiger Schwefelsäure nimmt die Zellulose Wasser auf und geht in Hydrozellulose oder Amyloid über, dem die Formel $(C_{12}H_{22}O_{11})_x$ zugeschrieben wird; daneben entstehen unter Spaltung Zellulosedextrine, welche gegen Säure- und Alkalispaltung weniger widerstandsfähig sind als Zellulose. Auf ein Gemenge solcher Zellulosedextrine hat Verf.[1]) den Presssaft von Merulius lacrimans wirken lassen und konnte nach längerer Zeit Reduktion in der Lösung, von Spaltprodukten herrührend, nachweisen.

B. Hemizellulasen (Zytasen).

Die Bezeichnung „Hemicellulosen“ ist von E. Schulze eingeführt worden, dem man eingehende Studien über diese Stoffgruppe verdankt, und wurde von Winterstein, Tollens u. a. angenommen; sie wird demgemäss hier beibehalten, wenn auch gleich betont werden muss, dass „Hemicellulosen“ chemisch keineswegs scharf abgegrenzt sind, sondern als eine ziemlich mannigfaltige Gruppe celluloseartiger Reservestoffe angesehen werden können, welche leichter als eigentliche Cellulose gespalten werden und dabei nicht nur Glukose liefern, sondern auch Mannose, Galaktose und Pentosen[2]). Demgemäss gehören hierher nicht nur die Mannane, Galaktane, Glukomannane usw., sondern auch Pentosane und Pentohexosane.

Bei dieser Verschiedenheit des Substrates ist es natürlich schwer, eine Vorstellung über die Einheitlichkeit der entsprechenden Enzyme zu erhalten.

1. Tierische Hemizellulasen.

Der Abbau von Hemizellulosen im Verdauungstraktus höherer Tiere hat bisher ebensowenig wie derjenige der echten Zellulosen auf Enzymwirkungen ihrer Verdauungssekrete zurückgeführt werden können, vielmehr scheint es sich auch hier durchweg um bakterielle Spaltungen zu handeln (Gatin, Saiki[3]), Scheunert, l. c.). Siehe auch unter Lichenase S. 73.

Dass die Hemizellulosenspaltung im Darm von Fischen von Darmenzymen herrührt (Knauthe), ist von E. Müller[4]) bestritten worden.

[1]) Euler, Zs angew. Chem. 25, 290; 1912.

[2]) Über eine Hemizellulose aus Apfelholz siehe Tottingham, Roberts und Lepkovsky, Jl. Biol. Chem. 45, 407; 1921.

[3]) Saiki, Jl Biol. Chem. 2, 251; 1906.

[4]) E. Müller, Pflüg. Arch. 83, 619; 1901.

Dagegen sind Hemizellulasen mit Sicherheit bei Evertebraten nachgewiesen, so z. B. bei Gastropoden[1]), Krustazeen und Insekten.

Besonders fanden Biedermann und Moritz, sowie Bierry und Giaja eine weitgehende und schnelle Spaltung von Hemizellulosen (Mannanen) im Verdauungstraktus von Helix pomatia. Die ersteren Forscher wiesen ein ähnliches Enzym im Lebersekret des Flusskrebses nach.

Ob die folgenden Enzyme wirklich spezifische Wirkungen ausüben und auf die betr. Substrate beschränkt sind, oder ob sie auch andere Hemizellulosen bezw. Polysaccharide angreifen, steht noch keineswegs fest.

Lichenase.

Das Substrat dieses Enyms, das Lichenin, findet sich besonders im isländischen Moos, Cetraria islandica. Es ist ein im kalten Wasser quellendes, in heissem Wasser lösliches hochmolekulares Kohlehydrat, welches von verdünnter Säure leicht hydrolysiert wird[2]) und, nach der Untersuchung von Ulander und Tollens[3]) neben d-Glukose auch etwas Mannose und Galaktose sowie Pentosen liefert.

Nach v. Tschermak[4]) soll das Lichenin im Kaninchendarm gespalten werden. Von den Renntieren wird das Islandsmoos gut verdaut und ausgenützt. In beiden Fällen kann es sich indessen um Bakterienwirkungen handeln.

Jewell und Lewis[5]) haben bei keinem Wirbeltier Verdauungssäfte finden können, welche Lichenin spalten; dagegen fanden sie bei 20 untersuchten Evertebraten im Verdauungskanal ein wirksames Enzym, das sie als spezifische Lichenase ansehen. Die Spaltung des Lichenins durch gewisse Evertebraten konnte im hiesigen Institut bestätigt werden.

Xylanase.

Seillière[6]) nimmt das Vorkommen eines auf Xylane spezifisch wirkenden Enzyms in Schnecken und in Larven holzzerstörender Käfer (Coleopteren) an.

2. Hemizellulasen der Phanerogamen.

Brown und Morris[7]) fanden zuerst eine Hemizellulase in keimenden Gerstenkörnern. Legt man in einen Auszug von gekeimter Gerste z. B. Kartoffel-

---

[1]) Biedermann und Moritz, Pflüg. Arch. 73, 291; 1898. Seillière, Soc. Biol. 68, 107, 989; 1910. — Bierry und Giaja, C. r. 148, 507; 1910 und Biochem. Zs 40, 370; 1912. Siehe daselbst auch ältere Literatur.

[2]) Die Hydrolyse des Lichenins zum Zweck der Vergärung und Herstellung von „Flechtenbranntwein" ist 1868 von Stenberg beschrieben worden (Monographie, Stockholm); das Verfahren wurde in Schweden während einiger Zeit in technischem Massstab ausgeführt und in Deutschland 1917 wieder geprüft. — Siehe auch norweg. Pat. 14664. B. Hansteen 1905.

[3]) Ulander und Tollens, Chem. Ber. 39, 401; 1906.

[4]) v. Tschermak, Biochem. Zs 45, 452; 1912.

[5]) Jewell und Lewis, Jl Biol. Chem. 33, 161; 1918.

[6]) Seillière, Soc. Biol. 58, 409, 940; 1905 und 63, 616; 1907.

[7]) Brown und Morris, Jl of Chem. Soc. 57, 497; 1890.

schnitte, so verlieren diese nach wenigen Stunden ihren Zusammenhang und fallen in Stücke, wobei die Zellwände anschwellen und in zahlreiche dünne Lamellen zerlegt werden. Indessen wird in dieser Weise durchaus nicht das Parenchym aller Pflanzen angegriffen, z. B. die Zellwände der roten Rübe nur schwach, die des Apfels überhaupt nicht, entsprechend dem verschiedenen chemischen Material der betreffenden Pflanzenteile[1]). Die Gräser sollen überhaupt reich an Hemizellulase sein[2]).

Auf das Vorkommen in den Palmensamen deuteten schon Beobachtungen von Sachs 1862. Versuche, dieses Enzym mit Glyzerin zu extrahieren, wurden von Green 1887 angestellt (Phil. Trans. 178); Brown und Morris (l. c.) konnten mit Wasser keine Extraktion erzielen. Später wurde das Enzym von Newcombe[3]) näher untersucht. Die Samen von Livistonia humilis, welche eine ähnliche Struktur besitzen wie die Dattelkerne, sind in dieser Hinsicht von Green[4]) studiert worden, dem man auch eine lesenswerte Darstellung über Zytasen in Phanerogamen verdankt[5]).

Nach Brown und Morris wird die Hemizellulase (Zytase) in den Zellen der Aleuronschicht sezerniert, nur wenig in denen des Skutellumepithels.

Darstellung: Ein wässeriger Malzauszug wird mit Alkohol gefällt, zur Entwässerung mit abs. Alkohol behandelt und im Vakuum getrocknet. Das nun haltbare und wirksame Pulver enthält, wie zu erwarten, neben der Zytase noch Amylase.

Aziditätsbedingungen: Nach den englischen Forschern soll das Enzym in schwach (essig-)saurer Lösung am wirksamsten sein.

Temperatur. Die obere Stabilitätsgrenze soll etwa 10° tiefer liegen als diejenige der Amylase.

Carubinase, Seminase.

Eine Reihe von einfachen und gemischten Mannanen sind beschrieben, aber wenige genügend genau definiert worden. So kommt es, dass über die Existenz eventueller spezifischer Enzyme noch kaum ein sicheres Urteil gefällt werden kann.

Unter den in höheren Pflanzen gefundenen Mannanen und Mannogalaktanen ist hinsichtlich seiner enzymatischen Spaltung besonders das Carubin (auch Caruban, Seminin[6]) oder Sekalin genannt) näher untersucht worden.

[1]) Siehe hierzu Reinitzer, H. 23, 175; 1897.
[2]) Gardiner, Proc. Roy. Soc. 62, 100; 1897.
[3]) Newcombe, Ann. of Bot. 13, 49; 1899.
[4]) Green, Ann. of Bot. 7, 93; 1893.
[5]) Reynolds Green, The Enzymes. Deutsch von Windisch, Berlin 1901.
[6]) Von Reiss (Chem. Ber. 22, 609; 1889) u. a. wird als Seminin ein reines Mannan bezeichnet und mit Paramannan identisch angenommen.

Das Carubin aus dem Samen des Johannisbrotbaumes (Ceratonia siliqua) liefert den Studien von Effront[1]) und Bourquelot und Hérissey[2]) zufolge bei der Hydrolyse d-Mannose neben wenig Galaktose, und wäre demnach als Galaktomannan anzusprechen.

Das zusammen mit dem Carubin im Johannisbrotsamen vorkommende Enzym hat Effront nachgewiesen und Carubinase genannt. Nach seinen Angaben kommt das Carubin auch in Roggen- und Gerstenkörnern vor; Bourquelot und Hérissey fanden es sowohl in Leguminosen (Medicago sativa, Trifolium repens, Trigonella), als auch in zahlreichen anderen Pflanzen, wie in Salep und in Orchideen. Sie nannten das Enzym Seminase.

Das Enzym lässt sich aus dem wässerigen Samenextrakt durch (das fünffache Volumen) Alkohol ausfällen.

Temperaturoptimum: Nach Effront 45°—50°; nach Bourquelot und Hérissey 35°—40°.

Aziditätsoptimum: Schwach saure Lösung.

Die Steinnuss (Phytelephas macrocarpa) soll in ihrem „Horneiweiss" nach Reiss, l. c., sowie nach Fischer und Hirschberger ein galaktosefreies Mannan enthalten. Bourquelot und Hérissey[3]) nahmen an, dass die Steinnuss ein besonderes Enzym enthält, welches dieses Mannan so angreift, dass es durch die Seminase weiter gespalten werden kann.

Auch in Phoenix soll ein auf die Mannane dieser Samen spezifisch wirkendes Enzym enthalten sein.

3. Hemizellulasen der Pilze und Bakterien.

Hier wäre der grösste Teil derjenigen Enzymwirkungen zu erwähnen, welche in der älteren Literatur den Zellulasen zugeschrieben worden ist. Die Spaltung wurde selten durch die entstehenden Zuckerarten charakterisiert, oft wurde sogar nicht reine Zellulose als Substrat verwendet, sondern Holz oder pflanzliche Organe, welche neben Zellulose reichlich andere höhere Kohlehydrate enthalten haben können und auf welchen nur Korrosionen beobachtet wurden. Als Ausgangspunkte für weitere Studien verdienen diese Angaben natürlich Beachtung[4]); einwandfrei nachgewiesen werden diese Enzyme aber erst durch Ermittlung und Isolierung der auftretenden hydrolytischen Spaltprodukte.

Ältere Angaben über die (vermutlich) enzymatische Zerstörung von pflanz-

[1]) Effront, C. r. 125, 38, 116; 1897.

[2]) Bourquelot und Hérissey, C. r. 129, 228, 391; 1899. — 130, 42, 340; 1900. — 133, 49; 1901. — Jl de Pharm. et de Chim. (6) 11, 104; 1900.

[3]) Bourquelot und Hérissey, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 10, 193; 1901. Soc. Biol. 55, 699; 1903.

[4]) Siehe hierzu R. Falck, Zerstörung des Holzes durch Pilze. Berlin, Springer 1916.

lichem Gerüstmaterial und Reservestoffen findet man bei Miyoshi[1]), De Bary (1886), Kean[2]), Wehmer[3]), Marshall Ward[4]), Newcombe[5]).

Auch Schellenberg[6]), dessen Gründlichkeit in botanischer Hinsicht anerkannt werden muss, beschränkt sich auf mikroskopische Beobachtung der Enzymwirkung und geht nicht auf die chemische Reaktion ein. Er nimmt die Existenz mehrerer Hemizellulasen (wenigstens vier nach seinen Untersuchungen) an.

Kellerman[7]) hat die Absonderung einer Zytase aus Penicillium pinophilum beobachtet. Nach Rudan[8]) scheidet das Myzel von Polyporus igniarius in verschiedenen Holzarten neben einem stärkelösenden auch ein zytolytisches Enzym ab.

Der einzige Forscher auf diesem Gebiet, welcher den Spaltprodukten und überhaupt den chemischen Vorgängen die erforderliche Aufmerksamkeit gewidmet hat, ist Pringsheim[9]). Er hat bei der Spaltung eines Mannanes aus Steinnussspänen durch eine aus Erde erhaltene (leider nicht näher definierte) Bakterienkultur das Auftreten einer Trimannose wahrscheinlich gemacht. Bestätigt sich dieser Befund, so ist er sehr bemerkenswert, da bisher nur Disaccharide, wie bei der Zellulose, noch nie aber Trisaccharide als enzymatische Abbauprodukte aufgefunden worden sind.

Hadromase.

Czapek[10]) nahm vor längerer Zeit an, dass im Holz eine ätherartige Verbindung der Zellulose mit dem „Hadromal" vorkommt, und dass diese Verbindung durch ein besonderes, in holzzerstörenden Pilzen gefundenes Enzym, die „Hadromase" gespalten wird. Da die Existenz des Hadromals zweifelhaft ist[11]), mag hier der Hinweis auf die betr. Literaturstelle genügen.

C. Inulinase.

An die Hemizellulasen wird hier die Inulinase angeschlossen, da das Inulin hinsichtlich seiner pflanzenphysiologischen Rolle etwa zwischen den Mannanen und der Stärke einzuordnen ist.

[1]) Miyoshi, Jahrb. wiss Bot. 28, 227; 1885.
[2]) Kean, Bot. Gaz. 15, 170; 1890.
[3]) Wehmer, Zbt. Bakt. II, 2, 140; 1896.
[4]) Marshall Ward, Ann. of Bot. 12, 565; 1898.
[5]) Newcombe, Ann. of Bot. 13, 49; 1899.
[6]) Schellenberg, Flora 98, 257; 1908.
[7]) Kellerman, U. S. Dep. Agric. Bur. Plant. Ind. 118, 29; 1913.
[8]) Rudan, Beitr. z. Biol. d. Pflanzen, 13, 375; 1917.
[9]) Pringsheim, H. 80, 376; 1912.
[10]) Czapek, Bot. Ber. 27, 141; 1899.
[11]) Siehe hierzu Grafe, Monatsh. f. Chemie 25, 1000; 1904. — Brown u. Tollens, Chem. Ber. 35, 1464; 1902.

Substrat: Das Inulin, gewöhnlich aus Knollen von Dahlien (und Helianthus tuberosus, Inula Helenium, Pyrethrum, Taraxacum), dargestellt, ist nach Tanret[1]) und Dean[2]) kein einheitlicher Stoff, sondern ein Gemenge mehrerer einander ähnlicher Körper. Tanret ist es gelungen (1893), das Inulin weitgehend zu reinigen. Tanret nimmt die Molekularzusammensetzung $30 (C_6H_{10}O_5) + 5 H_2O$ an. Auch sein Inulin enthielt nicht ausschliesslich Fruktose, sondern etwa $^1/_{12}$ d-Glukose. Neuere Ergebnisse von Irvine und Steele[3]), sowie von Karrer[4]) machen es aber wahrscheinlich, dass das Inulin das Polymerisationsprodukt einer reinen Anhydrofruktose ist. Ein Disaccharid ist bei der Spaltung von Inulin bis jetzt noch nicht nachgewiesen worden[5]).

Wolff und Geslin (C. r. 165) geben an, dass bei der enzymatischen Inulinspaltung Inulide als Zwischenprodukte entstehen, welche durch Hefe vergoren werden.

Die Spaltung in Fruktose wird durch verdünnte HCl bewirkt; die Magensalzsäure dürfte aber zu einer erheblichen Inulinspaltung nicht ausreichen[6]).

Vorkommen: Die Inulinase wurde von Green[7]) in Helianthus tuberosus entdeckt; sie befindet sich in ruhenden Samen im Zymogenzustand und wird bei der Keimung aktiviert. Vermutlich begleitet die Inulinase das Inulin in allen Monokotyledonen.

Darstellung: Besonders leicht kann man nach Green aus den fein gemahlenen Artischocken-Knollen das Enzym durch Extraktion mit Glyzerin gewinnen. Das Extrakt wird durch Dialyse gereinigt; die Spaltung des Inulins wurde von Green in pergamentenen Dialysierröhren nachgewiesen.

Die Verschiedenheit der Inulinase von der Amylase, welche Inulin nicht spaltet, ist sichergestellt.

In Pilzen und Bakterien scheint Inulinase recht verbreitet zu sein. Die ersten Versuche darüber verdankt man Bourquelot[8]); Dean[9]) und Boselli[10]) haben das Enzym in Schimmelpilzen nach der Züchtung auf inulinhaltigen Nährböden hervorrufen können.

Temperaturoptimum: (Pilzenzym) bei 55°.

Aziditätsoptimum: Aus Bourquelots und Bosellis Angaben ist zu schliessen, dass das Optimum des Pilzenzyms in sehr schwach saurer Lösung liegt.

---

[1]) Tanret, Bull. Soc. chim. (3) 9, 238; 1893.

[2]) Dean, Amer. Chem. Jl 32, 69; 1904.

[3]) Irvine und Steele, Jl Chem. Soc. 118, 1474; 1920.

[4]) Karrer und Lang, Helv. Chim. Acta, 4, 249; 1921.

[5]) Zur Chemie des Inulins und verwandter Kohlehydrate, wie Synanthrose, siehe H. Pringsheim, Die Polysaccharide, Berlin 1919; ferner Zemplén, Handb. d. bioch. Arbeitsmethoden 6, 23; 1912.

[6]) Ruth Okey, Jl Biol. Chem. 39, 149; 1919.

[7]) Green, Ann. of Bot. 1, 223; 1888.

[8]) Bourquelot, Bull. Soc. Mycol. France 10, 235. — C. r. 116, 1143; 1892.

[9]) Dean, Bot. Gaz. 35, 24; 1903.

[10]) Boselli, Ann. Inst. Pasteur 25, 695; 1911. — Siehe auch Colin, C. r. 170, 1010; 1920.

Lindner[1]) fand Inulinase auch in einzelnen Hefen, so in der Logoshefe, in Saccharomyces Marxianus, S. exiguus, S. Pombe.

Nach Avery und Glenn[2]) kommt Inulinase neben Saccharase und Amylase auch in Pneumokokken vor; Wirksamkeit zwischen pH = 5 und 8.

Auch in tierischen Organen soll Inulinase auftreten, nämlich nach Tanaka[3]) in Milz und Plazenta. Tschermak[4]) gibt an, dass die Inulinase im Darm von Kaninchen durch Inulinfütterung stark vermehrt wird. Im menschlichen Verdauungstraktus wird das Inulin vermutlich durch die Bakterien hydrolysiert.

Im Verdauungstraktus von Helix pomatia wird nach Bierry[5]) neben anderen höheren Kohlehydraten (vergl. S. 73) auch Inulin gespalten.

Analyse: Fruktose lässt sich neben Inulin nach der von Benedict[6]) angegebenen Modifikation der Lewis-Benedictschen Pikrat-Methode bestimmen.

Über die Abspaltung der Fruktose aus Raffinose, Gentianose und Stachyose siehe Kap. 5 und 6.

D. Pektinasen.

Hydrolysierende Enzyme der Gummiarten, Pflanzenschleime und Pektine.

Über die enzymatische Spaltung der obigen Kohlehydratgruppen ist noch äusserst wenig bekannt, obwohl das Studium derselben in mancher Hinsicht Interesse verdienen würde. So hat man z. B. noch kein Enzym gefunden, welches den Hefengummi, ein in den Kulturhefen reichlich vorkommendes Kohlehydrat, welches aus etwa gleichen Teilen Mannose und Glukose besteht, in seine Bestandteile zerlegt.

Zu den Pflanzenschleimen wird Agar-Agar gezählt, ein meist aus Florideen gewonnener Rohstoff, welcher neben anderen Kohlehydraten auch Gelose enthält. Die Gelose scheint ein Galaktan zu sein, ob ein reines oder gemischtes, lässt sich noch nicht sagen. Sie wird durch Jod violett gefärbt.

Gran[7]) hat einen Bazillus beschrieben und Bacillus gelaticus genannt, welchem er eine spezifisch-spaltende Wirkung auf Gelose zuschreibt. Durch die Einwirkung des Bac. gelaticus bezw. des darin enthaltenen Enzyms (?)

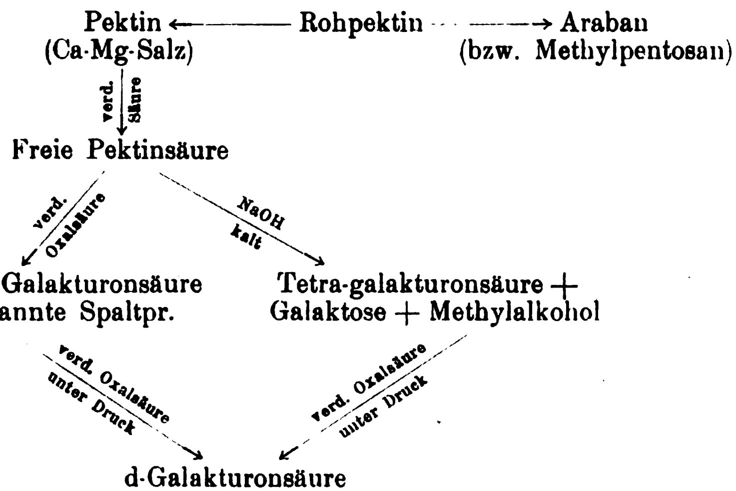
Gelase,

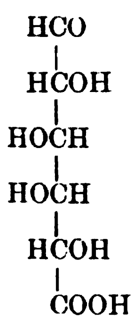
sollen reduzierende Stoffe auftreten, unter Verschwinden der Jodreaktion. Nach Bierry und Giaja[8]) hat Agar-Agar in Geleeform in Berührung mit den Verdauungssäften von Helix, Astacus, Homarus vulgaris u. a. niemals, auch nicht nach Wochen, reduzierenden Zucker ergeben.

[1]) Lindner, Woch. f. Brau. 17; 1900.
[2]) Avery und Glenn, Jl of exp. med. 32, 583; 1920.
[3]) Tanaka, Biochem. Zs 37, 249; 1911.
[4]) v. Tschermak, Biochem. Zs 45, 452; 1912.
[5]) Bierry, C. r. 150, 116; 1910. — Biochem. Zs 44, 402; 1912.
[6]) Benedict, Jl Biol. Chem. 34, 203; 1918.
[7]) Gran, Biochem. Zbt 1, Nr. 399; 1903.
[8]) Bierry und Giaja, Biochem. Zs 40, 386; 1912.

Eigentliche Pektinase (pektinspaltendes Enzym).

Substrat: Über die von Braconnot, Frémy und Payen entdeckten Pektine höherer Pflanzen, besonders der Zuckerrübe[1]), hat die letzte Zeit wesentliche Aufschlüsse gebracht. Nachdem schon Tollens und Zeisel die Gegenwart von Karboxylgruppen in Pektinen erkannt hatten, gelang es v. Fellenberg[2]) zu zeigen, dass Pektine die Methylester der Pektinsäuren sind, welche durch Wasserstoffionen und durch ein Enzym hydrolysiert werden. F. Ehrlich[3]) konnte dann das Rohpektin in ein Araban und eine eigentliche Pektinsäure zerlegen; nach seinen Untersuchungen ist das Pektin das komplexe Kalzium-Magnesiumsalz einer Anhydro-Arabinogalaktose-Methoxy-tetragalakturonsäure; die Spaltung wird durch folgendes Schema veranschaulicht[4]):





Die d-Galakturonsäure (siehe nebenstehende Formel) ist aus dem Pektin der Zitronenschalen 1917 von Suarez isoliert worden. Sie geht durch Oxydation in Schleimsäure über.

Mit Alkali liefert Pektin ausser Methylalkohol nach Tutin (Biochem. Jl 15) auch Azeton.

---

[1]) Besondere Pektinstoffe aus Meeresalgen, die der Arabonsäure nahestehen, hat Kylin (H. 94, 412; 1915) isoliert.

[2]) v. Fellenberg, Mitt. Schweizer Gesundheitsamt, 5—8, 1914—1916. — Biochem. Zs 85, 118; 1917.

[3]) F. Ehrlich, Chem. Ztg. 41, 197; 1917.

[4]) Eine gute Übersicht über den Stand der Pektinchemie hat 1917 Neuberg gegeben (Zs Ver. deutsch. Zuckerind. 67, 463; 1917).

Vorkommen: Ein Enzym, welches Pektinstoffe in Zucker spaltet, haben Bourquelot und Hérissey[1]) zuerst in gekeimter Gerste gefunden, wo es zugleich mit Amylase vorkommt. Der Umstand, dass Pektine durch Speichel nicht gespalten werden, zeigt, dass die „Pektinase“ von der Amylase verschieden ist.

Zahlreiche Bakterien vermögen Pektine zu hydrolysieren[2]). Die Abtrennung des Enzyms von der lebenden Zelle hat Jones[3]) durchgeführt, indem er die Zellen von Bac. carotovorus bei 54° tötete, während nach seinen Angaben das Enzym erst bei 62° inaktiviert wird.

Beyerinck und van Delden[4]) haben in Granulobacter. pectinivorum eine Pektinase nachgewiesen.

Darstellung: Jones hat aus dem von ihm untersuchten Bac. carotovorus ein Enzympräparat durch Alkoholfällung erhalten.

Aziditätsoptimum: Das Maximum der Stabilität und der Wirksamkeit scheint in neutraler Lösung zu liegen.

Gifte: Chloroform und Phenole hemmen nicht.

E. Anhang: Pektase.

Nach Frémy[5]) ist die Koagulation von Fruchtsäften eine enzymatische Reaktion. Der Vorgang, welcher der Koagulation zugrunde liegt, ist noch nicht aufgeklärt. Die Auffassung, die man sich von der Wirkung der Pektase gebildet hat, ist offenbar von den herrschenden Theorien und Hypothesen über die besser bekannten enzymatischen Koagulationen durch Thrombin und Chymosin stark beeinflusst.

Unter den neueren Arbeiten über Pektase sind diejenigen von Bertrand und Mallèvre, sowie von Bourquelot und Hérissey[6]) zu erwähnen.

Die erstgenannten Forscher kamen zunächst[7]) zum Ergebnis, dass zur Koagulation durch Pektase die Gegenwart löslicher Salze von Kalzium, Strontium oder Barium notwendig ist und nehmen an, dass das Koagulum aus einem Pektat des Kalziums (bzw. einer der alkalischen Erden) besteht.

Die enzymatische Umwandlung selbst wird nach Goyaud[8]) von der Gegenwart von Kalziumsalzen qualitativ nicht beeinflusst. Die Lösung kann nach seinen Befunden ebensowohl Kalium enthalten; Kalziumsalze bringen

---

[1]) Bourquelot und Hérissey, Soc. Biol. 50, 777; 1898. — Bourquelot, Jl de Pharm. et de Chim. 1899.

[2]) Siehe Lafars Hdbch. d. techn. Mykologie, III, S. 269, 1904, Kapitel X: Pektingärung.

[3]) Jones, Zbt Bakt. II, 14, 257; 1905.

[4]) Beyerinck und van Delden, Akad. v. Wetensch. Amsterdam 12, 2, 678; 1904.

[5]) Frémy, Jl de Pharm. 26, 392; 1840.

[6]) Bourquelot und Hérissey, Jl de Pharm. et de Chim. 8, 145; 1899.

[7]) Bertrand und Mallèvre, C. r. 119, 1013; 1894.

[8]) Goyaud, C. r. 135, 537; 1902.

die Reaktion nur zur Erscheinung, indem durch sie unlösliches Kalziumpektat entsteht.

Vorkommen: Die grosse Verbreitung der Pektase in der Pflanzenwelt ist durch eine Mitteilung von Bertrand und Mallèvre[1]) bekannt geworden. Aus der gleichen Mitteilung gehen auch die grossen Verschiedenheiten im Pektasegehalt der verschiedenen Arten und der Organe einer und derselben Art hervor. Bertrand gibt nachstehende Reihenfolge an, die festgestellt wurde, indem man eine gleiche Menge Pflanzenauszuges auf eine 2%ige, wässerige Pektinlösung wirken liess und die zur Koagulation erforderliche Zeit mass. (B. = Blätter; Fr. = Frucht; W. = Wurzel; Sch. = Schössling.)

Solanum Lycopersicum, Fr.	48 Std.	Syringa vulgaris, B.	20 Minuten
Vitis vinifera, nahezu reife Fr.	24 „	Ailanthus glandulosa, B.	20 „
Rheum rhaponticum	22 „	Daucus carota, junge W.	15 „
Ribes rubrum	15 „	Zea Mays, B.	8 „
Marchantia polymorpha	$2\frac{1}{2}$ „	Iris florentina, B.	3 „
Daucus carota, ausgewachs. W.	2 „	Trifolium pratense, Sch.	weniger als 1 Min.
Delphinium Staphisagria	$1\frac{1}{2}$ „	Medicago sativa, Sch.	weniger als 1 Min.
Ginkgo biloba, B.	$\frac{1}{2}$ „	Solanum tuberosum, B.	weniger als 1 Min.
		Brassica napus, B.	weniger als 1 Min.
		Lolium perenne, B.	weniger als 1 Min.

Frémy (l. c.) unterschied eine lösliche Pektase, wie sie besonders in Rüben vorkommt, und unlösliche Pektasen in sauren Früchten. Bertrand und Mallèvre[2]) wiesen hingegen lösliche Pektase auch in Säften von Äpfeln, Birnen und anderen Früchten nach und fanden, dass auch in diesen Koagulation erzielt wird, wenn man eine geeignete Menge verdünnten Alkalis zugibt.

Darstellung: Bertrand und Mallèvre stellten Pektasepräparate aus Klee und Luzerne durch Alkoholfällung dar, die sie — allerdings ohne Angabe von Zahlenwerten — als sehr wirksam bezeichneten.

Aziditätsoptimum: Die Säureempfindlichkeit der Pektase wurde schon von Bertrand und Mallèvre hervorgehoben. Ihre Angabe, dass Pektase bei Neutralität am besten wirkt, konnte vom Verfasser und Svanberg[3]) allerdings nicht bestätigt werden. Nach unseren eigenen Versuchen an den Säften reifer Beeren von Ribes nigrum, Ribes rubrum und Ribes grossularia liegt das Aziditätsoptimum bei pH = 4,3. Die Säfte dieser reifen Beeren selbst zeigten ziemlich übereinstimmend eine Azidität = 2,8 bis 2,96.

Aus der genannten Arbeit mag folgende Versuchsreihe als Beispiel angeführt werden. Durch Auspressen von Ribes rubrum wurde direkt der zu untersuchende Saft gewonnen.

---

[1]) Bertrand und Mallèvre, C. r. 121, 726; 1895.
[2]) Bertrand und Mallèvre, C. r. 120, 110; 1895.
[3]) Euler und Svanberg, Biochem. Zs 100, 271; 1919.

Anzahl ccm 2 n NaOH zu 15 ccm Saft	pH	Koagulationszeit; fest und homogen innerhalb
1,5	3,85	6 Stunden
1,75	4,05	3,5 „
2,0	4,20	3 „
2,25	4,42	3 „
2,5	4,60	3 „
2,75	4,80	3,5 „

Methodik: Genauere Messungen des Koagulationsverlaufes wären mit Dämpfungs-Viskosimetern auszuführen [1]). Bevor jedoch der chemische Vorgang der Pektase-Wirkung, besonders die Rolle der Aktivatoren, genauer bekannt ist, sind solche quantitativen Viskositätsmessungen vielleicht noch verfrüht.

[1]) Eingehende Untersuchungen über die Gelatinierung und über die Salzbildung von Pektin unter Berücksichtigung physikalisch-chemischer Gesichtspunkte verdankt man Dorothy Haynes, Biochem. Jl 8, 553; 1914 und Sven Odén, Intern. Zs f. Biol. 3, 83, 1917 und Bot. Ber. 34, 648; 1916.

4. Kapitel.

Amylasen.

Poly-(Okto-, Hexa- etc.)-Amylasen.

Wir wollen in diesem Kapitel diejenigen Enzyme behandeln, welche die Bestandteile der Stärke, ferner das Glykogen und endlich die nächsten Abbauprodukte dieser Stoffe zu spalten vermögen.

Zu den Schwierigkeiten, welche die wechselnden Verunreinigungen der Enzyme verursachen, kommt bei den Versuchen mit Stärke noch oft die Komplikation, die ein nicht einheitliches Substrat mit sich bringt.

In zahlreichen früheren Arbeiten hat man der Beschaffenheit der Stärke nicht die nötige Aufmerksamkeit geschenkt; eine genaue Definition des Substrates ist bei Untersuchungen über enzymatische Stärkespaltung besonders wichtig.

1. Substrat.

Stärke. Die Rohstärken des Handels enthalten im Mittel etwa 15% Wasser, welches sich nur schwer entfernen lässt. Die Verunreinigungen durch kleine Mengen Pflanzeneiweiss sind gering. Für enzymatische Arbeiten verwendet man gewöhnlich 1—2%ige „Lösungen" von „löslicher Stärke", welche nach verschiedenen Methoden, meist nach Lintner, hergestellt werden.

Es kann als feststehend angesehen werden, dass diese „löslichen Stärken" — auch wenn sie kein oder nur ein minimales Reduktionsvermögen aufweisen — keine einheitlichen Substanzen darstellen, sondern dass sie, wie das zu ihrer Herstellung verwendete Ausgangsmaterial, mehrere Substanzen, oder richtiger Substanzgruppen enthalten, die von verschiedenen Forschern verschieden bezeichnet worden sind. Nach dem Vorschlag von Maquenne und Roux fasst man diese Substanzen in zwei Gruppen unter den Namen „Amylose und Amylopektin" zusammen. Indessen ist es wohl möglich, dass es sich hier besonders um Unterschiede im Polymerisationsgrad bzw. Dispersitätsgrad handelt, wie Lintner mehrfach betont hat.

Die Amylosen sind charakterisiert durch ihre rein blaue Jodreaktion, durch ihren geringen Einfluss auf die innere Reibung des Wassers und die Wiederausscheidung aus den Lösungen beim Abkühlen (Retrogradation).

Das „Amylopektin" gibt mit Jod eine rotviolette Färbung, bildet mit Wasser Kleister, ruft also eine hohe Viskosität hervor. Chemisch ist es nach Samec[1]) charakterisiert durch seinen Gehalt an PO_4.

Für die Darstellung der Amylose und des Amylopektins sind von Roux bzw. von Gatin-Gruzewska Verfahren angegeben worden; entschiedene Fortschritte in dieser Hinsicht verdankt man Malfitano und Moschkoff[2]) und Samec[3]), wenn auch eine befriedigende Trennung der Stärkekomponenten noch nicht gelungen ist.

Bei der enzymatischen Spaltung der Amylose tritt als einziges Endprodukt Maltose auf. Dieser Abbau des Amylosemoleküls geht über Zwischenprodukte, welche als Dextrine bezeichnet wurden und erst in letzter Zeit eine erfolgreiche Bearbeitung gefunden haben.

Schardinger ist es 1903 gelungen, durch Einwirkung des Bacillus macerans aus der Stärke neben Azeton noch kristallisierende Kohlehydrate zu gewinnen, welche durch H. Pringsheim[4]) eingehend studiert und ihrer Zusammensetzung nach aufgeklärt worden sind. Pringsheim bezeichnet diese „kristallisierten Dextrine" Schardingers als Amylosen.

α-Dextrin = Tetraamylose $(C_6H_{10}O_5)_4 + 2\ C_2H_5OH$ $[\alpha]_D^{24} = +158{,}3^\circ$
β-Dextrin = Hexaamylose $(C_6H_{10}O_5)_6 + 9\ H_2O$ $[\alpha]_D^{24} = +138{,}9^\circ$.

Durch Azetylierung der Tetraamylose entsteht das Hexaazetat einer Diamylose, aus welchem beim Verseifen das Kohlehydrat $(C_6H_{10}O_5)_2 + 2\ H_2O$ hervorgeht, und in analoger Weise wird aus der Hexaamylose eine Triamylose $(C_6H_{10}O_5)_3 + 4\ H_2O$ gewonnen.

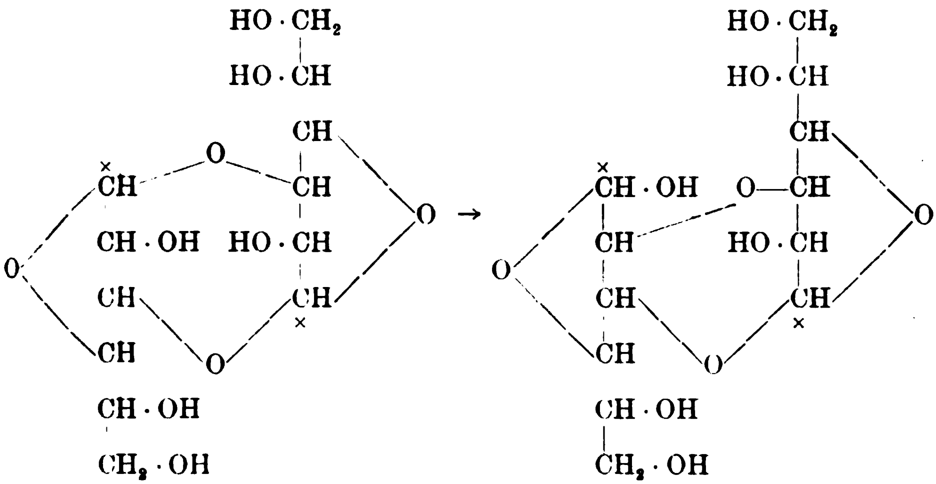
Pringsheim unterscheidet nunmehr also die folgenden Produkte[5]):

α-Reihe.	Temp.	$[\alpha]_D$
Oktamylose $[(C_6H_{10}O_5)_2]_4 + 4\ C_2H_5OH$	20	$+139{,}2^\circ$
α-Hexaamylose $[(C_6H_{10}O_5)_2]_3 + ?\ C_2H_5OH$	20	$+132{,}2^\circ$
Tetraamylose $[(C_6H_{10}O_5)_2]_2 + 2\ C_2H_5OH$	24	$+138{,}6^\circ$
Diamylose $(C_6H_{10}O_5)_2 + 2\ H_2O$	24	$+136{,}6^\circ$.

β-Reihe.	Temp.	$[\alpha]_D$
β-Hexaamylose $[(C_6H_{10}O_5)_3]_2 + 9\ H_2O$	24	$+157{,}9^\circ$
Triamylose $(C_6H_{10}O_5)_3 + 4\ H_2O$	24	$+151{,}8^\circ$.

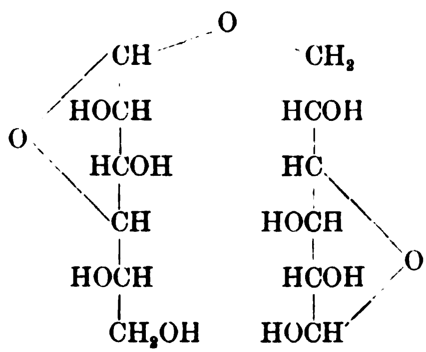
[1]) Samec, Kolloidchem. Beih. 6, 23; 1914.
[2]) Malfitano und Moschkoff, C. r. 150, 710; 1910. — 151, 817; 1910.
[3]) Samec und v. Hoefft, Kolloidchem. Beih. 5, 141; 1913. — Über die PO_4-Verbindung in der Stärke siehe Northrop und Nelson, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 472; 1915.
[4]) Pringsheim und Langhans, Chem. Ber. 45, 2533; 1912. — Pringsheim und Eissler, ebd. 46, 2959; 1913 und 47, 2565; 1914.
[5]) Siehe Pringsheim, Die Polysaccharide. Berlin 1919. — Es sei hier auch auf die neueren wertvollen Beiträge zur Stärkechemie verwiesen, welche man Karrer und seinen Mitarbeitern verdankt (Helv. 3 und 4; 1920, 1921).

Beim Azetylieren der höheren Amylosen mit Schwefelsäure tritt neben einer Depolymerisation auch noch eine Gruppenverschiebung ein, bei welcher unter Erhaltung einer Mindestmolekulargrösse wenigstens eine Aldehydgruppe frei wird. Pringsheim formulierte deshalb den Übergang der Diamylose in die Isodiamylose zunächst so:



Diamylose Isodiamylose

Nun ist seither durch die Arbeiten von Irvine und Dick[1]) sowie von Haworth und Leitch[2]) die Formel der Maltose endgültig festgelegt worden:



Ferner haben Karrer und Nägeli[3]) nachgewiesen, dass die α-Diamylose ein Anhydrid der Maltose ist, und diesem Befund muss jedenfalls die Diamyloseformel Rechnung tragen.

Pringsheim (l. c. S. 90) stellt sich den Stärkeabbau folgendermassen vor: „Zuerst erfolgt unter der schwachen Einwirkung von Säure oder unter der eines wenig aktiven Enzyms, wie z. B. des Auszuges aus ungekeimter Gerste, eine reine Löslichmachung durch blosse Depolymerisation, bei welcher

[1]) Irvine und Dick, Soc. 115, 593; 1919.

[2]) Haworth und Leitch, Soc. 115, 809; 1919.

[3]) Karrer und Nägeli, Helv. 4, 169; 1921.

die Blaufärbung durch Jod noch erhalten bleibt. Bei stärkerer Einwirkung von Säure oder durch ein aktiveres Enzym findet nun bei fortschreitender Depolymerisation eine Freilegung von Aldehydgruppen statt, welche unter gleichzeitiger Abnahme der Intensität der Jodfärbung die Ursache für die nach und nach zunehmende Reduktionskraft der sich bei stärkerem Abbau bildenden Dextrine darstellt. Weiterhin verschwindet die Jodfärbung ganz, ohne dass schon Maltose gebildet zu sein braucht, und man gelangt so zu den sog. Maltodextrinen. Naturgemäss laufen die beiden Phasen des Stärkeabbaues, die Depolymerisation und die Molekularverschiebung mit Freilegung der Aldehydgruppe nebeneinander her, und so erklärt es sich, dass weder durch den Säure- noch durch den fermentativen Abbau bisher jemals einheitliche Produkte gewonnen werden konnten; es handelt sich immer um Gemische von verschiedenem Polymerisationsgrad unter gleichzeitiger Beimengung von reduzierenden Dextrinen, die wiederum von verschiedener Molekulargrösse sein können."

Weizen-, Mais- und Reisstärke, welche mit sehr verdünntem Alkali gewaschen worden sind, zeigen nach Sherman, Walker und Caldwell[1]) die gleiche Verdaulichkeit, und zwar sowohl durch Speichel- und Pankreasals durch Malzamylase. Grössere Unterschiede in der Abbaugeschwindigkeit hat Pauletig[2]) gefunden.

Da weder die rohe Stärke, noch die „lösliche" Stärke eine einheitliche Substanz ist[3])[4]), so muss das Substrat der enzymatischen Spaltung durch sein chemisches Verhalten oder physikalische Konstanten charakterisiert werden. Wichtige Anhaltspunkte liefert die Aufnahmefähigkeit für Jod, und zwar wird man am besten die Jodaufnahme gelöster Stärke aus einer Benzollösung bestimmen; diese Jodaufnahme ist vom Verf., K. Myrbäck und Stig Bergman näher untersucht worden[5]).

Unter den diagnostisch brauchbaren physikalischen Eigenschaften der Stärkepräparate bzw. ihrer Lösungen ist besonders die Viskosität zu nennen, welche neuerdings von Samec[6]) eingehend untersucht worden ist.

Die röntgenspektrographischen Untersuchungen nach der Debye-Scherrerschen Methode[7]) bringen vielleicht weitere Aufschlüsse über den Bau der hochpolymerisierten Kohlehydrate. Karrer[4]) betrachtet „lösliche Stärke als Polymeres der Diamylose".

---

[1]) Sherman, Fl. Walker und Mary L. Caldwell, Jl Amer. Chem. Soc. 41, 1123; 1919.

[2]) Marius Pauletig, H. 100, 74; 1917.

[3]) Dieser Umstand hindert wohl auch die Kristallisation der „löslichen Stärke".

[4]) Siehe Karrer und Nägeli, Helv. 4, 263; 1921.

[5]) Euler und Myrbäck, Lieb. Ann. 426; 1922. — Euler und Bergman, Chem. Ber. 55; 1922. — Über Jodverbindungen der Hexa- und Tetraamylosen siehe Pringsheim und Eissler, l. c.

[6]) Samec, Kolloidchem. Beih. 6, 23; 1914.

[7]) Scherrer, Physik. Zs 17, 277; 1916 und 18, 291; 1917. — R. O. Herzog und Jancke, Chem. Ber. 53, 2162; 1920.

Glykogen liefert bekanntlich ebenso wie die Stärke als Endprodukt der diastatischen Spaltung Maltose; auch das Glykogen dürfte als eine Polyamylose zu betrachten sein, aber von anderem Polymerisationsgrad als Stärke[1]). Es wird durch den Bacillus macerans zu den gleichen Amylosen abgebaut wie Stärke (Pringsheim).

Glykogen löst sich zu einer opaleszierenden Flüssigkeit; es ist polymerisiert zum Molekulargewicht rund 100000. Glykogen nimmt, wie Stärke, Jod auf, und zwar unter Rotbraun-Färbung. Die Zusammensetzung ist wie diejenige der Stärke $(C_6H_{10}O_5)_x$. Während es durch Säuren leicht in Glukose gespalten wird, ist es Alkalien gegenüber ausserordentlich widerstandsfähig. Reines Glykogen reduziert ebensowenig wie Stärke.

Ausser dem tierischen Glykogen, der Leber und der Muskeln, kennt man noch einen demselben sehr nahestehenden, vielleicht mit ihm identischen pflanzlichen Stoff. Dieses Glykogen findet sich zwar nicht in grünen Pflanzen, ist aber in Pilzen, besonders in Hefen, ferner in Mucorarten und Bakterien sehr verbreitet.

2. Einteilung der Amylasen.

Eine Scheidung der stärkeabbauenden Enzyme in die Katalysatoren der verschiedenen Reaktionsphasen ist bis jetzt nicht gelungen. Zwar haben manche Forscher, nicht ohne Grund, ein stärkelösendes und ein stärkeverzuckerndes Enzym angenommen und auch in letzterem wiederum neben einer eigentlichen Amylase noch Dextrinasen vermutet; man würde demgemäss unter Einführung einer rationellen Nomenklatur zwischen Polyamylasen und niedrigeren Amylasen (Hexa-amylasen, Tetra-amylasen usw.) zu unterscheiden haben. Eine solche Trennung ist bis jetzt aber noch hypothetisch. Man hat die betr. Enzyme im Bacillus macerans zu suchen.

Wir teilen die Amylasen deshalb, wie andere Enzyme, nach ihrem natürlichen Vorkommen ein, und zwar in:

A. Tierische Amylasen,
B. Pflanzliche Amylasen.

Beide Enzymgruppen bilden Maltose als Endprodukt[2]). Wesentliche Unterschiede dürften zwischen den tierischen und pflanzlichen Polyamylasen nicht bestehen. Vielleicht stellen aber künftige genauere Messungen weitere Differenzen bezüglich Stabilität, Wirkungsbedingungen und Zusammensetzung fest[3]).

---

[1]) Siehe Pringsheim, Chem. Ber. 49, 364; 1916. — Karrer und Nägeli, Helv. 4, 263; 1921.

[2]) Musculus und v. Mering, H. 2, 403; 1878. — v. Mering, H. 5, 185; 1881. — Külz, Pflüg. Arch. 24, 81; 1881. — Karrer und Nägeli, l. c.

[3]) Verschiedenheiten zwischen Speichelamylase und Malzamylase sind schon von Defresne (C. r. 89, 1070, 1879) und von Bourquelot (C. r. 104, 71, 1887) angenommen worden.

A. Tierische Poly-Amylasen.

1. Speichel-Amylase (Ptyalin[1])).

Die stärkelösende Wirkung des Speichels ist 1831 von Leuchs entdeckt und dann von Schwann untersucht worden[2]).

Vorkommen: Beim Menschen scheint die Hauptmenge der Speichelamylase von der Parotis geliefert zu werden, während die Glandula submaxilaris verhältnismässig wenig Amylase abscheidet[3]). Das gleiche trifft im allgemeinen auch bei Tieren zu, sofern ihr Speichel überhaupt Amylase enthält.

Immerhin steht nunmehr wohl fest, dass Amylase auch bei neugeborenen Kindern sowohl in der Parotis (Zweifel, Korowin) als in der Submaxillaris[4]) vorkommt. Die Stärkeverdauung bei jungen Kindern hat Shaw[5]) untersucht.

Im normalen menschlichen Speichel scheint der Amylasegehalt unregelmässig zu schwanken; siehe hierzu Schultz in Oppenheimers Handb. d. Biochemie 3, 1, 27; 1908. Wesentlich für die Beurteilung dieser Verhältnisse ist der Umstand, dass der Salzgehalt des Speichels wechselt.

Pathologische Veränderungen beim menschlichen Speichel: Im allgemeinen sind hier keine grösseren Abweichungen von der normalen Amylaseproduktion oder sonst auffallende Resultate gefunden worden[6]). Kleinere Schwankungen können oft in Ungleichheiten der Versuchsbedingungen (Azidität, Salzgehalt) ihren Grund haben.

Bei Diabetes nach Wisel keine Veränderung. Auch bei Verdauungsstörungen des Darmes konnte Burger[7]) keine Abnahme der Speichelamylase nachweisen. Nach Jawein[8]) kein Effekt bei Fieber und bei Tuberkulose. Bei Geisteskrankheiten fand Christiani[9]) die Speichelamylase vermehrt.

Tierischer Speichel: Starke Amylasewirkungen sind beim Schwein gefunden worden, ferner bei Ratten.

Bei Pflanzenfressern ist im allgemeinen die Amylasewirkung des Speichels ziemlich schwach, so z. B. beim Pferd (Ellenberger und Hofmeister, Hayden[10])). Beim Rind hat C. C. Palmer[11]) starke zeitliche und individuelle Schwankungen gefunden. Die Amylase soll aus dem Blut stammen. Siehe auch Blutamylase S. 108.

---

1) Die Bezeichnung Ptyalin soll von Berzelius stammen.
2) Ältere Schriften über Speichelamylase siehe bei Schlesinger, Virch. Arch. 125, 146.
3) Siehe Grützner, Pflüg. Arch. 16, 105; 1877. — Mestrezat, Bull. Soc. Chim. (4) 3, 711; 1908.
4) Schilling, Jahrb. Kinderheilk. 58, 518; 1903. Siehe daselbst auch ältere Arbeiten.
5) Shaw, Albany Med. Ann. 1904 nach Biochem. Zbt. 2, 1458; 1904.
6) Litmanowicz und E. Müller, Zbt. Physiol. u. Path. d. Stoffw. N. F. 4, 81, 1909.
7) Burger, Münch. med. Wochenschr. 43, 220; 1896.
8) Jawein, Wiener med. Presse 1892, 578. Zitiert nach Oppenheimer.
9) Christiani, Zbt. med. Wiss. 506; 1905.
10) C. E. Hayden, Amer. Jl Physiol. 45, 461; 1918.
11) C. C. Palmer, Amer. Jl Physiol. 41, 4; 483; 1916.

Bei Fleischfressern soll Amylase im Speichel nach Mendel und Carlson oft ganz fehlen[1]. Bei der Katze wird Amylase von der Gl. submaxillaris ausgeschieden. Kaninchen sezernieren A. aus der Parotis oder auch überhaupt nicht[2]. Fische enthalten nach Krukenberg A. im Speichel; Schlangen nach Launay (1903) nicht.

Darstellung: Die Reindarstellung des stärkespaltenden Speichelenzyms ist noch nicht befriedigend ausgearbeitet. Cohnheim hat schon vor langer Zeit vorgeschlagen, das „Ptyalin“ durch Kalziumtriphosphat zu adsorbieren und dann den Niederschlag mit Wasser auszuziehen; dabei geht das Enzym in Lösung und kann dann mit Alkohol gefällt werden. — Man kann auch den Speichel zunächst mit Alkohol fällen oder aussalzen und dann diese Fällung mit Wasser digerieren, wobei ein Teil der Verunreinigungen ungelöst bleibt. — Auch durch Glyzerinextraktion der Mundschleimhaut erhält man in gewissen Fällen brauchbare Präparate.

Aziditätsbedingungen: Wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird, ist die Wirkung der Speichelamylase in erster Linie von der Anwesenheit von Neutralsalzen, und zwar ihrer Anionen, abhängig. Je nach der Natur dieser Neutralsalze liegt das Gebiet der optimalen Azidität.

Die ersten, nach modernen Gesichtspunkten ausgeführten Versuche verdankt man E. W. Ringer und van Trigt[3], welche die Lage der optimalen Reaktion in Phosphat- und Azetatmischungen bei 37° zu pH = 6,00 fanden, und zwar ziemlich übereinstimmend mit der Zuckerreduktionsmethode von Bertrand und mit der Jodmethode. In Zitratlösungen zeigte sich die Lage der optimalen Reaktion von der Konzentration des Puffers abhängig.

Michaelis und Pechstein[4] fanden nach Salzzusätzen folgende Wirkungsoptima:

Salz:	Phosphat, Azetat, Sulfat	Chlorid, Bromid	Nitrat
pH:	6,1 bis 6,2	6,7	6,9.

Die gleichen Autoren fanden empirisch folgende Regel: Je kleiner die Affinität eines Anions zur Diastase ist, bei um so saurerer Reaktion liegt das Wirkungsoptimum der Diastasekomplexverbindung.

Norris fand bei seinen Versuchen mit Glykogen als optimale Azidität pH = 6 bei 37°.

In neuester Zeit hat Amandus Hahn[5] den Einfluss von Puffern bzw. Neutralsalzen auf das Aziditätsoptimum untersucht. Er arbeitete mit 0,013 Mol. Phosphat bzw. 0,01 Mol. Azetatpuffer und 0,2 Mol. Salzzusätzen. Für Speichelamylase fand Hahn die Optima:

---

[1] A. J. Carlson und Chittenden, Amer. Jl Physiol. 26, 169; 1910.
[2] Ryan, Amer. Jl Physiol. 24, 234; 1909.
[3] W. E. Ringer und van Trigt, H. 82, 484; 1912.
[4] Michaelis und Pechstein, Biochem. Zs 59, 77; 1914.
[5] A. Hahn und Michalik, Zs f. Biol. 73, 10; 1921.

bei Phosphatpuffer pH = 6,4 bis 6,5
bei Azetatpuffer 5,6.

Der Optimalpunkt pH = 6,5 wird durch die sehr eingehende Untersuchung von E. Ernström[1]) bestätigt, dessen Arbeit die Fig. 6 entnommen ist[2]). Die Kurve gilt bei 37° für 0,058 n. Phosphat und 0,017 n. NaCl.

1 ccm Enzymlösung + 20 ccm 0,29 n. Phosphatlösung + 100 mg NaCl + 50 ccm 2%ige Stärkelösung, alles verdünnt auf 100 ccm.

Als natürliche Azidität des Speichels wird von Michaelis und Pechstein pH = 6,9 angegeben.

Neutrale Alkalisalze verschieben nach Hahn[3]) bei Speichelamylase (wie auch bei Malzamylase) den isoelektrischen Punkt nach der sauren Seite, und

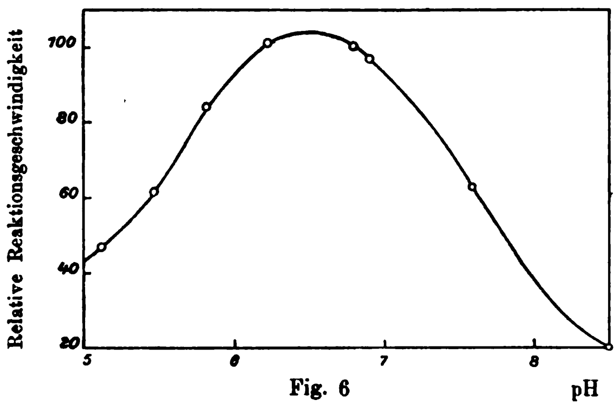


Fig. 6

zwar soll die Verschiebung durch Na-Salze stärker sein als durch K-Salze. Michaelis und Pechstein (l. c.), welche den isoelektrischen Punkt aller Salz-Amylase-Komplexe zwischen 10^{-5} und 10^{-6} fanden, heben die Schwierigkeit hervor, einen isoelektrischen Punkt der Speichelamylase mit der bei anderen Enzymen möglichen Genauigkeit zu bestimmen.

Salzwirkung: Völlig salzfreie Speichelamylase ist unwirksam auf Stärke[4]). Wirksam wird sie erst durch ihre Verbindung mit Neutralsalzen; jede der entstehenden Enzym-Salzverbindungen hat ganz charakteristische Eigenschaften, welche überwiegend von der Natur des Salzanions abhängen. Michaelis (Monographie, S. 75) fügt diesen Resultaten folgendes zu:

„Die Vereinigung der Amylase mit den einzelnen Anionenarten zu den wirksamen Komplexen stellt eine unvollständige chemische Reaktion dar, die

[1]) E. Ernström, H. 117; 1921.

[2]) Eine Extrapolation dieser Kurve zeigt, dass Ptyalin im Magen höchstens 3 % seiner maximalen Wirksamkeit entfalten kann, also praktisch unwirksam ist; zu diesem Resultat ist, soweit die damaligen Anschauungen und Methoden Schlüsse gestatteten, Hammarsten schon 1871 gelangt. Vergl. hierzu Pastore, Atti Acc. d. Lincei 29, 271; 1920.

[3]) A. Hahn und Harpuder, Zs f. Biol. 71, 287; 1920.

[4]) Norris (Biochem. Jl 7, 26 und 622; 1913) war mit Glykogen als Substrat zum gleichen Ergebnis gekommen. — Dialyse inaktiviert nicht nur durch Salzentziehung (Olsson).

zu einem Gleichgewicht führt. Die Affinität der Amylase zu den einzelnen Anionenarten ist verschieden gross; sie ist sehr gross bei NO_3'; nicht viel kleiner bei Cl′, Br′; sehr klein bei SO_4'', Azetat, Phosphat.

Jede einzelne dieser Amylase-Komplexverbindungen stellt einen Körper dar, der die Eigenschaften der übrigen Enzyme ganz regulär an sich trägt; er ist als Enzym wirksam nur als Anion, die Wirksamkeit hängt wie sonst von der Azidität ab.

Die relative enzymatische Wirksamkeit dieser verschiedenen Komplexverbindungen auf Stärke ist sehr verschieden. Am stärksten wirkt die Cl′-Verbindung (fast ebenso Br′); viel schwächer die NO_3'-Verbindung und noch sehr viel schwächer die Sulfat-, Azetat-[1]) und Phosphatverbindungen."

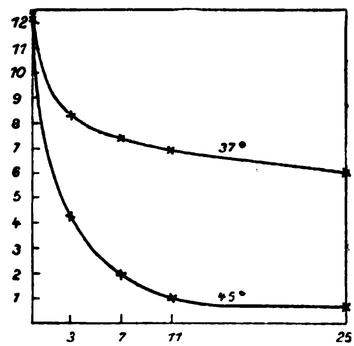


Fig. 7.

„Befindet sich die Amylase in einer Mischlösung von verschiedenen Salzen, unter denen etwas Nitrat ist, so bindet sich die Amylase fast ganz an das Nitrat, zu dem sie die grösste Affinität hat. Da aber Nitrat-Amylase wenig wirksam auf Stärke ist, so hemmen Nitrate die Wirkung der Amylase gegenüber derjenigen Wirkung, wie sie ohne das Nitrat, nur bei Gegenwart der anderen Salze, besonders der Chloride, wäre. Fehlen aber Nitrate in der Salzlösung (wie z. B. im Speichel selbst), so bindet sich die Amylase ganz an das Chlor und es bildet sich die äusserst wirksame Chlor-Amylase, deren Wirkungsoptimum bei pH = 6,7 liegt.

Die besonders starke Wirkung des Chlorions ist besonders durch die eingehende Arbeit von Wohlgemuth[2]) zweifellos festgestellt; dass Br′ und J′ ähnlich wirken, hatten Neilson und Terry[3]) angegeben. Den Einfluss der Konzentration von BrK und JK hat Fricker[4]) untersucht.

Für 0,058 n. Phosphatlösung und wechselnde NaCl-Mengen (mg in 100 ccm) gibt Ernström (l. c.) die bei pH = 6,5 ermittelte Kurve (Fig. 8, S. 95), welche die Konzentrationsfunktion des Kochsalzes anschaulich macht.

Das Optimum erstreckt sich etwa von 1—1,6 ‰. Es ist bemerkenswert, dass dieses mit dem NaCl-Gehalt des Speichels sehr nahe übereinstimmt.

Um auch dem kolloidchemischen Standpunkt Rechnung zu tragen, sei erwähnt, dass J. T. Groll[5]) die Wirkung der Anionen bei der Verzuckerung durch Ptyalin mit der bekannten Anionenreihe der Kolloidchemie in Verbindung setzt.

---

[1]) Rockwood (Jl Amer. Chem. Soc. 41, 228; 1919) fand auch die Anionen der Weinsäure und der Oxalsäure sehr wenig bzw. nicht wirksam, während nach einer älteren Beobachtung von John (Virch. Arch. 122, 271; 1890) Oxalsäure stark hemmen soll.

[2]) Wohlgemuth, Biochem. Zs 9, 1; 1908. — Siehe auch Kübel, Pflüg. Arch. 76, 276; 1899.

[3]) Neilson und Terry, Amer. Jl Physiol. 22, 43; 1908.

[4]) Fricker, Arch. Verdau. 16, 162 und 369; 1910.

[5]) J. T. Groll, Arch. Néerl. Phys. 2, 516; 1918.

Die zahlreichen Widersprüche in den Angaben über die Phosphatwirkung (Roger, Bang, Löb) beruhen darauf, dass der Einfluss der Anionen nicht scharf vom Aziditätseinfluss unterschieden wurde.

Was die anorganischen Kationen betrifft, so bedürfen die Angaben über die Aktivierung des Speichelenzyms durch Ca¨ (Wohlgemuth, Bang[1])) sowie durch Mg¨ (Brunacci, Bull. Sc. Med. 80) noch weiterer Bestätigung.

Dass eines der oben genannten Anionen für die Stärkespaltung durch Speichel unbedingt erforderlich ist, geht auch aus der nunmehr oft bestätigten Tatsache hervor, dass die Wirksamkeit von amylasehaltigen Flüssigkeiten oder Extrakten durch Dialyse stark vermindert und schliesslich ganz aufgehoben werden kann.

Organische Aktivatoren: Zahlreiche ältere Angaben über die aktivierende Wirkung von Proteinen und deren Abbauprodukten[2]) dürften darauf zurückzuführen sein, dass diese Stoffe als Puffer die Reaktionslösung der optimalen Azidität nähergebracht und so die Reaktionsgeschwindigkeit vergrössert haben. Asparagin ist mehrfach als besonderer Aktivator bezeichnet worden. In neuerer Zeit hat Rockwood[3]) wieder angegeben, dass α-Aminosäuren, und zwar aliphatische wie aromatische (alle drei Aminobenzoesäuren in gleichem Grade) aktivieren, nicht dagegen Säureamide. Bei Malzamylase ergeben sich Unterschiede, wie Versuche von Sherman und Florence Walker und von U. Olsson (vgl. S. 113 u. ff.) gezeigt haben.

Eine aktivierende Wirkung der Galle fand Wohlgemuth[4]) bei der Speichelamylase, wie bei anderen tierischen und pflanzlichen Amylasen, und zwar auch, wenn er wegen des Kochsalzgehaltes der Galle korrigierte. Wesentlich ist in dieser Arbeit der Nachweis, dass der aktivierende Bestandteil der Galle eine kochbeständige und dialysable Substanz ist.

Die Behauptung von Buglia[5]), dass die aktivierende Wirkung der Galle durch die Natriumsalze der Glykocholsäure und Taurocholsäure bedingt sei, haben Wohlgemuth[6]) und Minami nicht bestätigen können.

Auch im Serum sehr vieler Tiere und in deren Organen fand Wohlgemuth (l. c. 1911) eine kochbeständige dialysable Substanz, welche alle tierischen Amylasen aktiviert. Diese Substanz ist noch unbekannt; sie ist

---

1) Bang, Biochem. Zs 32, 417; 1911.

2) Siehe z. B. Roger, Soc. Biol. 64, 16; 1908.

3) Rockwood, Jl Amer. Chem. Soc. 39, 2745; 1917. Vgl. aber Wohlgemuth, l. c. 1908.

4) Wohlgemuth, Biochem. Zs 21, 432; 1909. — Groll (Ned. Tijdschr. Geneesk. 64; 1920) untersuchte neuerdings die Galle selbst, also die Summe aller Gallenbestandteile und fand eine Aktivierung der Speichelamylase nur bei geringer Gallenkonzentration (0,1 %), während mittlere Konzentrationen keine und Konzentrationen über 5 % eine hemmende Wirkung ausübten (vergl. die Unterschiede gegenüber Pankreasamylase S. 101).

5) Buglia, Biochem. Zs 25, 239; 1910.

6) Siehe Wohlgemuth, Biochem. Zs 33, 303; 1911.

sicher nicht, wie behauptet worden ist, Lezithin, denn dieses ist nach dem Befund von Lapidus[1]) auf Ptyalin ganz unwirksam.

In diesem Zusammenhang muss auch darauf aufmerksam gemacht werden, dass die Anwendung der Methodik von Wohlgemuth bei Versuchen mit Organextrakten, Seren usw. nicht unbedenklich ist, wie überhaupt der Bestimmung des gebildeten Zuckers mit Fehlingscher Lösung wegen ihrer grösseren Sicherheit in vielen Fällen der Vorzug zu geben ist.

Paralysatoren.

Anorganische Stoffe. Während Cl′, Br′ und J′ beschleunigen, können Fluoride hemmen[2]) (dass Flusssäure dies tut, hatte schon Effront[3]) angegeben). Offenbar hängt ihre Wirkung von den übrigen, in der Lösung vorhandenen Ionen ab.

Schwermetallsalze scheinen auf Ptyalin einen ähnlichen Einfluss auszuüben wie auf Malzamylase (vergl. S. 114). Die ersten Versuche über Hg-Vergiftung verdankt man Hata[4]). Eine von U. Olsson[5]) angestellte Versuchsreihe zeigt, dass auch die Vergiftung des Ptyalins mit $CuSO_4$ eine mit der Zeit fortschreitende Reaktion ist; den zeitlichen Verlauf dieser Vergiftung ersieht man aus Fig. 7. Die Ordinaten bezeichnen Reaktionskonstanten.

Auch Jod vergiftet stark; in einer $1,6 \cdot 10^{-5}$ normalen Jodlösung hatte Ptyalin nach 11 Minuten schon 52% seiner Wirksamkeit verloren.

Über den schädlichen Einfluss der Kalziumsalze siehe Pozerski, Soc. Biol. 60; 1906. Kolloide Metalle sind nach Wohlgemuth (l. c. 1908) in verdünnter Lösung ohne Wirkung. Metalle hemmen durch Spuren in Lösung gehender Ionen (Baumgarten; Luger).

Organische Stoffe. Ptyalin ist, wie schon Bd. I, S. 157 erwähnt, gegen 50%igen Alkohol verhältnismässig unempfindlich. Formaldehyd inaktiviert in 0,05 n-Lösung in 1 Stunde um rund 50% (U. Olsson). Dagegen ist Anilin nach dem gleichen Autor ein weniger starkes Gift gegen Ptyalin; die Inaktivierung nimmt mit der Zeit zu (in 1/40 n-Anilinlösung verlor das Enzym nach 70 Minuten 9%, nach 27 Stunden 30% seiner Aktivität).

Kende[6]) gibt an, dass der enzymatische Abbau der Stärke und des Glykogens durch Seifen der höheren Fettsäuren gehemmt wird, gleichgültig, ob man Speichel-, Pankreas- oder Malzamylase verwendet. Es bleibt nachzusehen, ob es sich hier nicht um eine Aziditätsbeeinflussung handelt. Benzylalkohol[7]) fällt Eiweiss und hemmt schon in sehr grosser Verdünnung.

---

[1]) Lapidus, Biochem. Zs 30, 39; 1911.

[2]) Wohlgemuth, l. c. 1908, S. 18. — Rockwood, Jl Amer. Chem. Soc. 41, 228; 1919. — Kübel (l. c. 1899) sowie Patten und Stiles, Amer. Jl Physiol. 17, 26; 1906 fanden eine Beschleunigung.

[3]) Effront, Bull. Soc. Chim. (3) 4, 627; 1890.

[4]) Hata, Biochem. Zs 17, 156; 1909.

[5]) U. Olsson, H. 117; 1921.

[6]) Kende, Biochem. Zs 82, 9; 1917.

[7]) J. Jacobson, Soc. Biol. 83, 1054; 1920.

Kinetik.

Schon der Umstand, dass es sich beim Stärkeabbau nicht um eine einzige Reaktion handelt, sondern um eine Reihe von Teilreaktionen, erschwert die Deutung der kinetischen Resultate. Dazu kommt noch die Frage, ob und in welchem Grad das Substrat — in der Regel lösliche Stärke — als einheitlicher Stoff betrachtet werden kann. Schliesslich darf — wie schon bei der Besprechung der Methodik betont wurde — nicht übersehen werden, dass an der enzymatischen Reaktion Stärke-Maltose, möglicherweise mehrere Enzyme beteiligt sind. Auch ev. Maltase-Wirkung ist zu berücksichtigen.

Schon 1885 ist es Chittenden und Smith aufgefallen, dass die Bildung des Zuckers aus Stärke nicht glatt zu Ende geht, sondern dass im Verlauf der Reaktion eine Hemmung aufzutreten scheint. Man hat diese Hemmung, welche man auch bei der Wirkung der Pankreas-Amylase und der Malzamylase wiederfindet, der durch die Reaktion gebildeten Maltose zugeschrieben, indem man einerseits an das Auftreten eines Gleichgewichtszustandes zwischen Substrat und Reaktionsprodukten gedacht hat, wie etwa das Gleichgewicht zwischen einem Ester und Alkohol + Säure, oder indem man angenommen hat, dass das Enzym ganz oder zum Teil von der Maltose gebunden wird. Eine solche Bindung ist ja in anderen Fällen bereits nachgewiesen, besonders genau zwischen Saccharase und Rohrzucker (vergl. Bd. I, S. 111ff.).

Mc Guigan[1]), der ebenfalls von einem Gleichgewicht spricht, das eintreten soll, wenn etwa 70% der Stärke verzuckert sind, findet jedoch durch seine eigenen Versuche, dass die Hemmung durch Maltose und Glukose nicht ausreicht, um die Verlangsamung der Reaktion nach Spaltung von 70% Stärke zu erklären; er meint, dass ein anderes, noch unbekanntes Abbauprodukt stärker hemmen muss als Maltose. Das Enzym war beim „Gleichgewicht“ noch aktiv.

Im übrigen findet Mc Guigan mit seiner allerdings nicht besonders genauen Methodik[2]), dass in 30 Minuten von der gleichen Speichelmenge prozentisch angenähert gleich viel Stärke verzuckert wird, wenn die Konzentration der löslichen Stärke (Merck) von 2—10% variiert wurde; in verdünnteren Lösungen wurde prozentisch weniger verzuckert. Ferner erzeugt nach seinen Versuchen das gleiche Volumen Speichel in wachsenden Mengen 1%iger Stärkelösung innerhalb gleicher Zeiten die gleiche Menge Zucker.

Einige nach der Jodmethode und der Verzuckerungsmethode (Bertrand) angestellte vergleichende Versuchsreihen von C. L. Evans[3]) sind noch zu

---

[1]) Mc Guigan, Jl Biol. Chem. 39, 273; 1919.

[2]) Auch in den älteren Arbeiten (Maszewski, H. 31, 58; 1900. — Bielfeld, Zs f. Biol. 41, 360; 1901. — Simon, Jl de Phys. Path. 9, 261; 1907) bleibt der Einfluss der Azidität und der Neutralsalze ganz unberücksichtigt.

[3]) Evans, Jl of Physiol. 44, 191; 1912.

erwähnen; untersucht wurde der Abbau einer 3%igen Stärkelösung bei 46° durch 1 : 10 verdünnten Speichel. Es ergab sich das gewöhnliche Resultat, dass bei kleinen Enzymmengen und erheblichem Substratüberschuss die Anfangsgeschwindigkeit proportional der Enzymmenge E ist.

E	1	2	3	5
% Maltose in 10 Min.	0,077	0,150	0,202	0,385

Bei kleinen Enzymmengen sind also auch die Reaktionskoeffizienten k (berechnet unter Annahme eines Endzustandes nach 75% des theoretisch möglichen Umsatzes) proportional der im gegebenen Volumen enthaltenen Enzymmenge.

Wie überhaupt bei Enzymreaktionen kommt es hier auf die relativen Mengen Enzym und Substrat an (vergl. Bd. I, S. 106); dazu kommt noch

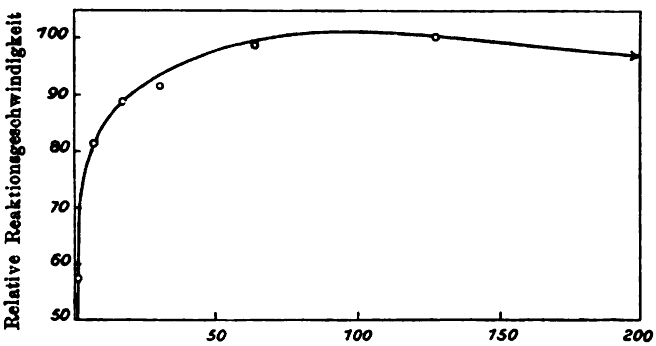


Fig. 8.

speziell bei den Amylasen die Salzkonzentration, deren Einfluss aus der Fig. 8 hervorgeht.

Einfluss der Temperatur.

Was zunächst die Temperatur-Stabilität des Ptyalins selbst betrifft, so ist dieselbe stark von der Azidität abhängig; diese Funktion ist zum ersten Male von E. Ernström[1]) einwandfrei festgestellt worden.

In zugeschmolzenen Röhren wurde die Enzymlösung 60 Minuten lang bei verschiedener Azidität auf 50° gehalten. Nach der Erhitzung wurden die Lösungen zur Stärkeverzuckerung verwendet, welche bei optimalem pH (6,5) in Gegenwart von 100 mg NaCl bei 37° ausgeführt wurde.

Die Fig. 9 zeigt, dass das Ptyalin bei pH = 6,0—6,1 am stabilsten ist, also in etwas saurerer Lösung als der maximalen Wirkung (6,4—6,5) entspricht.

Über die Möglichkeit, Komponenten der Speichelamylase durch fraktionierte Hitze-Inaktivierung zu trennen, geben die früheren Arbeiten keinen sicheren Aufschluss. Nach Bourquelot[2]) kann man einer Amylase durch geeignetes Erhitzen die Fähigkeit zur Endverzuckerung nehmen, während sie

[1]) Ernström, H. 118; 1921.
[2]) Bourquelot, C. r. 104, 576; 1887.

gegenüber den ersten Teilreaktionen des Stärkeabbaus ungeschwächt wirksam bleibt. Dies wird aber von Slosse und Limbosch[1]) bestritten; diese konnten keine verschiedenen Temperaturempfindlichkeiten eventueller Amylase-Komponenten feststellen und nehmen deshalb nur eine einzige Speichelamylase an.

Einen ausserordentlich starken Einfluss auf die Stabilität hat der Kochsalzgehalt der Lösung, wie sich aus der Fig. 10 (Ernström) ergibt.

Die in der Abszisse angegebenen mg NaCl beziehen sich auf 11 ccm Lösung (1 ccm Enzymlösung + 5 ccm Phosphatlösung + 5 ccm Wasser); darunter steht die NaCl-Normalität. Optimales pH; 1 Stunde auf 55° erhitzt. Nach Abkühlung 1 ccm dieser Enzymlösung + 50 ccm 2%iger Stärkelösung + 49 ccm Phosphatlösung + 2 g NaCl. 37°. Optim. pH.

Die Stabilität ist in einer ca. 0,1 n-Kochsalzlösung etwa 25 mal so gross wie in der praktisch kochsalzfreien Lösung[2]). Bei weiter steigender NaCl-

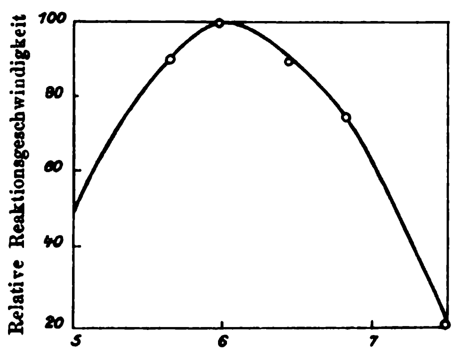


Fig. 9.

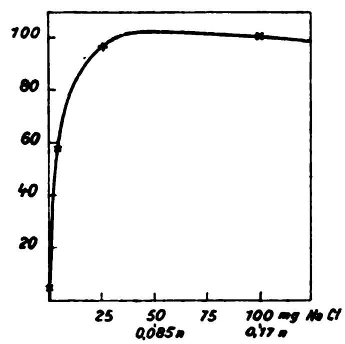


Fig. 10.

Konzentration sinkt dann die Stabilität wieder, wie die folgenden Zahlen Ernströms zeigen:

mg NaCl in 11 ccm-Lösung	NaCl-Normalität	Relat. Reakt. konst.
100	0,17	100
1000	1,7	58,5
2000	3,4	17

Die Kochsalzkonzentration der grössten Stabilität ist also etwa 10 mal so gross wie die Kochsalzkonzentration der grössten Aktivität; dabei ist allerdings zu bedenken, dass der Einfluss auf die Aktivität bei 37°, derjenige auf die Stabilität bei 55° festgestellt ist.

Zu dieser „Schutzwirkung" des Natriumchlorids addiert sich dann noch die Schutzwirkung durch das Substrat und die Spaltprodukte, die bei der Malz-Amylase näher besprochen wird.

Hinsichtlich der Definition und Bestimmung der „Tötungs-Temperatur" sei auf Bd. I, S. 189 verwiesen.

---

[1]) Slosse und Limbosch, Arch. intern. Physiol. 6, 365; 1908.

[2]) Vgl. hierzu die Angaben von Vernon bezügl. Pankreas-Amylase S. 103.

Ernström fand das Enzym um so temperaturempfindlicher, je verdünnter es war, obwohl Azidität und Kochsalz-Konzentration konstant waren.

Die Angaben Biedermanns[1]) über hohe Temperaturstabilität und Regeneration des Ptyalins sind so auffallend, dass sie noch einer weiteren Prüfung bedürfen.

Reaktionsgeschwindigkeit.

Slosse und Limbosch (l. c.) finden ein offenbar flaches Maximum der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen 50° und 58°, während Evans 46° als „optimale Temperatur" bezeichnet. Wie im I. Band dieses Werkes näher auseinandergesetzt wurde, lässt sich eine „Optimaltemperatur" nicht allgemein feststellen. Als Temperaturkoeffizient $k_{t+10} : k_t$ kann für das Temperaturgebiet 10—30° rund 2 angegeben werden, A ist dann etwa 12000. Zwischen 30° und 40° wächst A stark mit der NaCl-Konzentration (Ernström). Von 30° an sinkt der Temperaturkoeffizient stark, möglicherweise zum Teil deswegen, weil sich die Verbindung Ptyalin-NaCl dissoziiert. Bei kleinen NaCl-Mengen fällt der Temperatur-Koeffizient, bzw. A, zwischen 40° und 45° auf 0, dagegen ist A bei optimalem NaCl im gleichen Temperaturgebiet rund 8000; auch zwischen 30° und 40° ändert sich A stark mit dem NaCl-Zusatz (Ernström).

Stärkekörner als Substrat. O. Hammarsten[2]) hat bereits 1871 festgestellt, dass Speichel die rohen Körner der verschiedenen Stärkesorten mit verschiedener Geschwindigkeit angreift.

Stärke	Zucker nach	Stärke	Zucker nach
Kartoffel	2—4 Stunden	Korn	10—15 Minuten
Erbsen	1³/₄—2 „	Hafer	5— 7 „
Weizen	¹/₂—1 Stunde	Roggen	3— 6 „
		Mais	2— 3 „

Diese Unterschiede beruhen in der Hauptsache nicht auf den Amylosen, sondern auf der Verschiedenheit der die Stärkekörner umgebenden Schicht; sie fallen, wie Hammarsten nachwies, fort, wenn die Stärkekörner fein gemahlen oder gekaut werden. Dass also die verschiedenen Stärken durch Amylasen, und zwar sowohl tierische als pflanzliche, annähernd gleich schnell gespalten werden, wird durch eine neue Untersuchung von Sherman, Florence Walker und M. L. Caldwell[3]) bestätigt.

[1]) Biedermann, Fermentforschung 1, 385; 1916 und die folgenden Bände der gleichen Zeitschrift. — Ferner Lowartz, ebenda 3, 241; 1920.

[2]) Hammarsten, Uppsala läkareffören. förhandl. 6, 471; 1871. — Verschiedene Stärken sind später untersucht worden von: Solera, Malys Jb. 1875. — Lea, Jl of Physiol. 11, 234, 1890. — Kübel, Pflüg. Arch. 77, 276; 1898.

[3]) Sherman, Florence Walker und M. L. Caldwell, Jl Amer. Chem. Soc. 41, 1123; 1919.

2. Pankreas-Amylase.

Bouchardat und Sandras entdeckten 1845 die Fähigkeit des Pankreassaftes, Stärke zu verzuckern.

Öfters ist behauptet worden, dass die Pankreasamylase mit der Speichelamylase identisch ist. Indessen lassen sich zwischen beiden Enzymen Unterschiede feststellen, die zwar gering, aber doch deutlich sind[1]).

Vorkommen: Unter den untersuchten Pankreas-Säften bzw. Extrakten scheint derjenige des Schweines am meisten Amylase zu enthalten[2]); schwächer wirken Hund[3]), Rind[2]) und Schaf[1])[2]) in einer nicht übereinstimmend festgestellten Ordnung. Auch im Embryo vom Rind ist P.-A. nachgewiesen worden[4]). Kommt nach Zweifel nicht bei neugeborenen Menschen vor. Soll bei Pankreaserkrankungen zuweilen fehlen.

Den Amylasegehalt des Pankreas fand Grützner (1876) zu verschiedenen Zeiten nach aufgenommener Nahrung verschieden gross.

Dass der Pankreas sowohl der Menschen als aller daraufhin untersuchten Tiere hinsichtlich des Amylasegehaltes alle anderen Organe weit übertrifft, geht aus einer Untersuchung von Hirata[5]) hervor.

Darstellung: Als Ausgangsmaterial kommt zunächst der Pankreassaft in Betracht, wie man ihn am besten durch permanente Fisteln gewinnt; ferner die frische oder getrocknete Pankreasdrüse, welche mit Wasser bzw. Salzlösung ausgezogen wird (Norris). Vernon[6]) extrahiert, wie früher v. Wittich, mit Glyzerin und fällt mit Alkohol.

Die beste Darstellungsmethode verdankt man Sherman und seinen Mitarbeitern. Sherman und Schlesinger[7]) fanden das Enzym in 50%igem Alkohol ziemlich stabil. Sie extrahieren 20 g trockenes Pankreaspulver mit 200 ccm 50%igem Alkohol während 5—10 Minuten und filtrieren. Das Filtrat wird mit dem 7fachen Volumen einer Mischung von 1 Teil Alkohol und 4 Teile Äther gefällt. Nach 15 Minuten hat sich ein öliger Niederschlag gebildet, welcher durch Dekantieren von der Lösung getrennt und wieder in möglichst wenig Wasser gelöst wird. Bei Zusatz zu der 5fachen Menge Alkohol fallen nun Flocken aus, die man bei Zimmertemperatur absitzen lässt und dann abfiltriert. Man löst den Rückstand in 200—250 ccm 50%igem Alkohol, der etwa 5 g Maltose enthält. Aus einem Kollodiumsack wird hierauf die Lösung gegen 2000 ccm 50%igem Alkohol dialysiert, welchen man im

---

1) Vernon, Jl of Physiol. 28, 156; 1902.

2) Roberts, Proc. Roy. Soc. 32, 145; 1910. — Floresco, Soc. Biol. 48, 77; 1896.

3) C. Hamburger, Pflüg. Arch. 60, 545; 1895.

4) Stauber, Pflüg. Arch. 114, 619; 1906.

5) Hirata, Biochem. Zs 27, 385; 1910. — L. H. Davis und Ross (1921); Hauptquelle der Blutamylase (siehe S. 108).

6) Vernon, Jl of Physiol. 29, 302; 1903. Diese Methode führt aber nach Vernon und Sherman-Schlesinger zu einer weitgehenden Schwächung des Enzyms.

7) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 33, 1195; 1911 und 34, 1104; 1912.

Verlauf von 40 Stunden noch zweimal erneuert. Schliesslich wird der Inhalt des Kollodiumsacks filtriert und in das gleiche Volumen Alkohol—Äther eingetragen. Auf diese Weise wird ein sehr wirksames Präparat erhalten. Allerdings wird durch diese Methodik — wie Sherman, Garard und La Mer[1]) zeigen — nur etwa 5% von der im Ausgangsmaterial vorhandenen Amylase in gereinigtem Zustand wieder gewonnen. Die Präparate enthalten auch noch eine Proteinase und etwas Maltase.

Eigenschaften der gereinigten Präparate: Die Reinigung der Pankreasamylase ist durch Sherman und seine Mitarbeiter schon so weit getrieben worden, dass es sich bereits lohnt, die chemischen Eigenschaften und die Wirksamkeit der gewonnenen Präparate anzugeben, wenn die Resultate auch durch inaktive Beimengungen noch sehr erheblich entstellt sind.

Die Elementaranalyse[2]) gab:

C 51,9%; H 6,6%; N 15,3%; S 1,0%; P 0,8%.

Folgende Reaktionen fielen positiv aus: Hopkins-Coles Tryptophanreaktion, Xanthoproteinreaktion, Biuretreaktion und Reaktion nach Millon. Die wässerige Lösung koaguliert bei 70°; das Koagulum gibt violette, das Filtrat rosa Biuretreaktion.

Die nähere Untersuchung des Stickstoffs[3]) nach van Slyke ergab an 2 Präparaten:

Stickstoff	Wirks. 3300 n. Sk. = 127 Sf.	Wirks. 2200 n. Sk. = 86 Sf.
NH_3	8,1%	9,1%
Melanin	5,3	6,1
Arginin	14,6	14,7
Histidin	6,0	6,9
Lysin	7,4	7,0
Cystin	2,5	2,2
Amino-N des Filtrats	50,4	49,1
Nicht-N des Filtrats	4,6	4,1

Wirksamkeit. Sherman und seine Mitarbeiter geben die Wirksamkeit ihrer Präparate in der von ihnen selbst eingeführten Skala („n. Sk.") an. Ihre besten Pankreaspräparate werden durch die Zahlen charakterisiert:

3600 n. Sk. = 5400 Lintner-Einh.

Dies entspricht in unseren Einheiten **140 Sf.**

Aziditätsbedingungen: Ältere Bestimmungen über den Einfluss von Säuren und Basen sind durch die neuerdings von Sherman, Thomas

[1]) Sherman, Garard und La Mer, Jl Amer. Chem. Soc. 42, 1900; 1920.
[2]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 34, 1104; 1912.
[3]) Sherman und Gettler, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1790; 1913.

und Baldwin[1]) festgestellte Kurve I (Fig. 11) überholt. Dieselbe zeigt ein Maximum bei etwa pH = 7 (genauer 6,8) an.

Salzwirkung: Auch Pankreasamylase ist in Abwesenheit von Salzen inaktiv; sie verliert nach Bierry[2]) durch erschöpfende Dialyse ihre Wirksamkeit völlig.

Der bedeutende Einfluss geringer Neutralsalzmengen ist von Nasse 1875 gefunden, später von Grützner, Vernon[3]), Bierry und Giaja[4]), Preti, Slosse und Limbosch (1908) und neuerdings von Kendall und Sherman[5]) näher untersucht worden. Letztere Forscher erkannten, dass die Aziditätsfunktion und die Neutralsalzfunktion voneinander abhängen. Sie

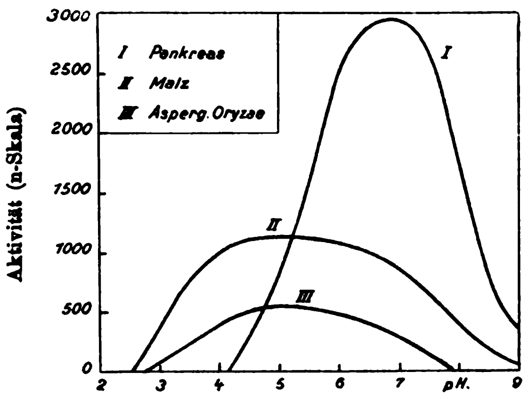


Fig. 11.

geben für eine gegebene Menge von Na_2HPO_4 den Einfluss von NaCl durch eine Kurve an (l. c. S. 1094).

Im übrigen kann man aus den eingehenden Angaben dieser Forscher schliessen, dass sich Pankreasamylase hinsichtlich der Salzwirkung ziemlich analog verhält wie Speichelamylase, so dass also auch hier die Darstellung von Michaelis (S. 90 u. ff.) Gültigkeit hat.

Aktivatoren. Hier haben Kendall und Sherman[5]) besonders festgestellt, dass die früher behauptete Aktivierung durch Asparagin, soweit nicht die Azidität beeinflusst wird, nur sehr gering sein kann.

Monoaminosäuren der Glykokollreihe fand Terroine[6]) stark aktivierend, und zwar spezifisch. Ob die von Pozerski[7]) angegebene Peptonwirkung spezifisch ist, bleibt zu untersuchen.

[1]) Sherman, A. W. Thomas und Baldwin, Jl Amer. Chem. Soc. 41, 231; 1919.
[2]) Bierry, Biochem. Zs 40, 357; 1912.
[3]) Vernon, Jl of Physiol. 27, 174; 1901 u. 28, 156, 375; 1902.
[4]) Bierry und Giaja, Soc. Biol. 60, 479; 1906. — 62, 432; 1907.
[5]) Kendall und Sherman, Jl Amer. Chem. Soc. 32, 1087; 1910.
[6]) Terroine und Weill, Jl de Phys. Path. 14, 437; 1912.
[7]) Pozerski, Thèse, Paris 1902.

Der von Lapidus behauptete günstige Einfluss von Lipoiden wird von Starkenstein und Minami bestritten.

Die Galle enthält einen kochbeständigen Aktivator für Pankreasamylase[1]). Ob aber gallensaure Salze beschleunigen, wie Buglia[2]) und Korentschewsky (1911) angeben, ist nach den negativen Befunden von Wohlgemuth (l. c. 1909) und Minami[3]) zweifelhaft.

Paralysatoren. Eine Reihe älterer Untersuchungen liegt vor, besonders über den Einfluss von Alkaloiden; da aber die ältere Methodik keine eindeutigen Resultate liefert, führen wir die Beobachtungen nicht besonders an. Die Ähnlichkeit der Pankreasamylase mit dem Ptyalin lässt vermuten, dass die an letzterem Enzym gewonnenen Resultate (vgl. S. 93) im wesentlichen auch für das Pankreasenzym gültig sind.

Kinetik.

Sowohl die Versuche von V. Henri[4]) als die eingehenderen von Ch. Philoche[5]) berücksichtigen leider nicht hinreichend den grossen Ein-

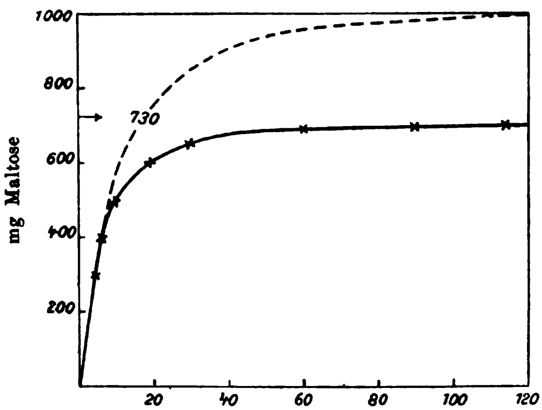


Fig. 12.

fluss der Azidität (und der Neutralsalze); eine neue Bearbeitung der Kinetik dieses Enzyms unter Berücksichtigung der modernen Anschauungen und Methoden wäre dankenswert.

Für den zeitlichen Verlauf der Verzuckerung in Stärkekonzentrationen von 1—3% ist die Kurve der Fig. 12 charakteristisch. Der immer wiederkehrende „Grenzwert" liegt bei etwa 70—78% der theoretisch möglichen Maltosemenge. Nimmt man diesen Wert als Endwert, so lassen sich aus

---

1) Wohlgemuth, Biochem. Zs 33, 303; 1911.
2) Buglia, Biochem. Zs 25, 239; 1910.
3) Minami, Biochem. Zs 39, 339; 1912.
4) V. Henri, Thèses, Paris 1903.
5) Ch. Philoche, Jl de Chim. Phys. 6, 212 u. 355; 1908.

den Zahlen für a—x Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung berechnen, die einigermassen konstant sind.

Die Reaktionskonstanten sind aber nicht, wie die Theorie fordert, von der Substratkonzentration a unabhängig, sondern sie sind der Substratkonzentration in gewissen Grenzen umgekehrt proportional, so dass dann k . a = konstant ist. Demgemäss sind die Anfangsgeschwindigkeiten bzw. die im Anfang der Reaktion pro Zeiteinheit umgesetzten Mengen von der Stärkekonzentration 4—1 % ziemlich unabhängig und fallen in grösserer Verdünnung zwar etwas, aber viel weniger als die Stärkekonzentration.

Versuch von Kendall und Sherman, l. c. 1910. In 100 ccm-Lösung 0,15 mg Pankreatin, 700 mg NaCl und 10 ccm 0,02 Mol. Dinatriumphosphat. Reaktion 1 Stunde bei 40°.

Konzentration der Stärkelösung in %:	4	2	1	0,5	0,3	0,2	0,1
mg Cu_2O gebildet:	78	76	69	66	60	58	48

Was die Art des Substrates betrifft, so stellte Frl. Philoche an 2%igen Lösungen fest, dass Stärke durch die gleiche Menge Pankreas-Enzym etwa doppelt so schnell verzuckert wird als Glykogen. Da bei Anwendung von Malzamylase das Geschwindigkeitsverhältnis 1 : 20 und in schwachen Enzym-Konzentrationen sogar 1 : 100 ist, so kann man daraus den Schluss ziehen, dass Pankreasamylase an ihr natürliches Substrat Glykogen angepasst ist, sofern der erwähnte Befund nicht durch äussere Faktoren veranlasst ist. Ungekochte Stärke fand die gleiche Verfasserin so reaktionsfähig wie gekochte. Bemerkenswert für die Verwertung der bis jetzt vorliegenden kinetischen Resultate ist eine Untersuchung von Sherman und Schlesinger[1]), in welcher festgestellt wird, dass unter der Einwirkung von Pankreas-Amylase die Menge der umgewandelten Stärke etwa doppelt so gross ist als die Menge der gebildeten Maltose, unabhängig davon, ob ein (weniger wirksames) Handelspankreatin oder ein hochaktives Präparat angewandt wurde.

„Amyloklastische Kraft“	„Zuckerbildende Kraft“
760	380
16000	8940

Im Gegensatz hierzu erwies sich bei Anwendung von Malzamylase 66—90% der verwandelten Stärke verzuckert.

In diesem Zusammenhang sei auch noch erwähnt, dass sowohl für den zeitlichen Verlauf der Stärkespaltung wie für den Einfluss der Enzym- und Substratkonzentrationen zahlreiche Formeln aufgestellt worden sind (V. Henri, Philoche, Kendall und Sherman). Ein Hinweis auf die erwähnten Arbeiten muss genügen, da eine nähere Einsicht in den Vorgang der enzymatischen Verzuckerung durch diese Formeln nicht gewonnen worden ist.

[1]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1784; 1913. — Siehe auch die bemerkenswerte Arbeit von Kendall und Sherman, l. c. 1910.

Der Arbeit von Sherman, Thomas und Baldwin entnehme ich folgende Zahlen über den Einfluss der NaCl-Konzentration; sie gilt für 40° und eine Na_2HPO_4-Konz. = 0,001 Mol. per Liter.

NaCl Mol. per Liter	Wirksamkeit (neue Skala)
0,0001	450
0,01	2690
0,02	2715
0,03	2750
0,05	2900
0,06	2875
0,07	2830
0,085	2835
0,10	2830

Das Maximum würde hiernach etwa bei der Normalität 0,05 liegen, entschieden höher als bei der Speichelamylase nach Ernström. Hierzu ist noch zu erwähnen, dass nach einem Befund von A. Gross[1]) das NaCl-Optimum bezüglich des Stärkeabbaus (gemessen durch Jodreaktion) und der Verzuckerung das gleiche ist, während in dieser Hinsicht bei Taka-Amylase Verschiedenheiten bestehen.

Temperatur.

Hier liegen keine exakten Daten über die maximale Enzym-Stabilität der substratfreien Amylase vor. Es geht aus den älteren Versuchen von Roberts (1881) und den neueren von Vernon[2]) schon hervor, dass die Stabilität in kochsalzfreier Lösung viel geringer ist, als in Gegenwart dieses Elektrolyten. Dies wird durch eingehendere Versuche von Sherman und Schlesinger[3]) bestätigt. Pankreasamylase ist in wässeriger Lösung schon bei 5—10° bedeutend weniger stabil als Malz-Amylase (dies gilt natürlich für den bis jetzt erreichten Reinheitsgrad). Quantitative Angaben findet man in Shermans Tabelle S. 1307; dort wird auch auf die grosse Labilität dialysierter Amylaselösungen eingegangen.

Was die Reaktionsgeschwindigkeit der Pankreas-Amylase bei verschiedenen Temperaturen betrifft, so müssen hier in Ermangelung von anderen Angaben die „Optimum-Temperaturen" erwähnt werden. Nach Vernon liegt sie in salzarmer Lösung bei 35°. In Anwesenheit von 0,2 % NaCl fand er die maximale Wirkung bei 50°; die Wirksamkeit hörte auf zwischen 65 und 70°. Nach Kendall und Sherman ist der Temperaturkoeffizient der salzarmen Lösung bereits zwischen 21° und 40° negativ, während er bei Gegenwart von Salz normal ist. Die Autoren geben folgende Zahlen an:

[1]) Siehe Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1784; 1913.
[2]) Vernon, Jl of Physiol. 27, 190; 1901.
[3]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 1305; 1915.

In 100 ccm-Lösung 10 ccm 0,02 Mol. Dinatriumphosphat und 700 mg NaCl; 0,5 mg Enzympräparat wirken während 1 Stunde bei folgenden Temperaturen:

Temperatur:	21	30	40	45	50	55	60	65
mg Cu_2O:	65	122	238	298	345	378	256	66

Der Temperaturkoeffizient zwischen 20° und 40° ist der schon von Vernon festgestellte und auch für andere Amylasen öfters gefundene, wonach eine Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit für eine Temperatursteigerung von 10° eintritt. Über 40° sinkt der Temperaturkoeffizient bis etwa 55°, wo das „Optimum" gefunden wird. Vermutlich liegen die Temperaturverhältnisse ähnlich wie bei der Speichelamylase, wo sie exakter untersucht worden sind.

Sherman und Schlesinger (1915) geben an, dass in der ca. 1%igen Lösung ihres gereinigten Pankreas-Präparates Nr. 60 (300 mg in 30 ccm Wasser) zwischen 50° und 55° Koagulation eintrat; das Koagulum betrug 11,6% des ursprünglichen Trockengewichts und enthielt 16,9% N, während im nicht-koagulierten Anteil 14,9% N gefunden wurden.

Zymogen der Pankreas-Amylase. Die inaktive Ausgangsform des Enzyms, welche man Zymogen nennt (ohne es irgendwie charakterisieren zu können), ist bei der Pankreas-Amylase nicht mit Sicherheit bekannt. Nach Lintwarew[1]) kommt Pankreas-Amylase nur in aktiver Form vor. Vernon[2]) nimmt ein unlösliches Prozymogen an — analog dem Prozymogen des Trypsins —, welches direkt in das lösliche aktive Enzym übergehen soll.

3. Darm-Amylase.

Wenn auch nunmehr feststeht, dass der Dünndarm seine eigene Amylase besitzt (Röhmann[3]), Grünert[4]) Brown und Heron[5]), Tebb[6])), so ist doch die Menge der Amylase im Fistelsaft nur gering[7]). Nach Röhmann ist Amylase im Jejunum reichlicher vertreten als im Ileum; Brown und Heron fanden beim Schwein beide Teile gleich wirksam, das Duodenum verhältnismässig wenig; sie schreiben die Enzymabsonderung den Peyerschen Drüsen zu. Nach Grützner (Pflüg. Arch. 16; 1877) enthalten die Brunnerschen Drüsen keine Amylase. Im Dickdarmsekret des Hundes fanden Wakabayashi und Wohlgemuth sehr wenig Amylase.

Jedenfalls ist die Schleimhaut selbst viel wirksamer als der Darmsaft.

Ambard und Binet[8]) finden, dass der Amylasegehalt des Hundedarms sich mit der Ernährung nicht ändert.

---

1) Lintwarew, Biochem. Zbl. 1, 201; 1903.
2) Vernon, Jl of Physiol. 28, 137; 1902.
3) Röhmann, Pflüg. Arch. 41, 424; 1887.
4) Grünert, Zentralbl. f. Physiol. 5, 285; 1892.
5) Brown und Heron, Lieb. Ann. 204, 228; 1880.
6) Tebb, Jl of Physiol. 15, 42; 1893.
7) Mendel, Pflüg. Arch. 63, 425; 1896 („paralytischer Darmsaft"). — Nagano, Mitt. Grenzgeb. Med. Chir. 9, 393; 1902 (menschl. Fistelsaft). — Pregl, Pflüg. Arch. 61, 288; 1895 (Fistelsaft des Schafes). — Bierry und Frouin, C. r. 142; 1565; 1906.
8) Ambard und Binet, Soc. Biol. 65, 259; 1908.

Amylasen im Verdauungstraktus niedrigerer Tiere.

Der Magensaft des Flusskrebses (Potamobius astacus L.) ist in neuerer Zeit eingehend von Lowartz untersucht worden. Auch dieses Enzym wird durch NaCl aktiviert. Ein „Temperaturoptimum" wird zwischen 43° und 46° angegeben; Erwärmung auf 95° (Zeit?) soll noch keine vollständige Hemmung bewirken, und gekochter Magensaft soll lösliche Stärke „abbauen" (beurteilt nach der Jodreaktion); dabei soll es sich um eine „Regeneration" des aus der löslichen Stärke unter Mitwirkung des inaktivierten Enzyms im Sinne von Biedermann handeln.

Diese Arbeit, wie auch diejenigen von Biedermann, zeigen, wie wünschenswert es ist, dass bei solchen Untersuchungen wenigstens die Grundbegriffe der chemischen Dynamik berücksichtigt werden. Im Sekret der Mitteldarmdrüse des Flusskrebses sind übrigens schon früher zahlreiche Enzyme nachgewiesen worden; Hoppe-Seyler[1]) fand unter diesen auch Amylase. Unter anderen Wirbellosen hat man besonders Würmer (Frédéricq, Krukenberg) und Gastropoden, am meisten Helix pomatia[2]) hinsichtlich des Amylasegehaltes studiert. Bei allen Mollusken scheint die Mitteldarmdrüse, auch Hepatopankreas oder zuweilen Leber genannt, verhältnismässig reich an Amylase zu sein.

4. Leber-Amylase.

Die stärkespaltende Fähigkeit der Leber des Menschen und höherer Tiere ist durch v. Wittich[3]) und Claude Bernard[4]) entdeckt worden. Eves (1884) erzielte bereits mit einem alkoholbehandelten Präparat aus Schafleber Stärkespaltung. Den Nachweis eines wirklichen diastatischen Enzyms in der Leber, dessen Existenz eine Zeitlang in Abrede gestellt wurde, verdankt man Pavy[5]), Tebb[6]), Pick[7]) und Dastre[8]).

Vorkommen. Die Leber ist nach Wohlgemuth ein verhältnismässig amylasearmes Organ ($D_{24}^{38°}$ = 10—200 in Wohlgemuths Einheit). Nach Macleod[9]) ist der Hund am reichsten an Leberamylase, dann folgen Schwein, Kaninchen[10]) und Lamm. In der Rattenleber[11]) beträgt der Amylasegehalt in der Wohlgemuthschen Einheit gemessen $D_{24}^{38°}$ = 156—250. Der Enzymgehalt in Seiten- und Mittellappen der Froschleber[12]) ist annähernd gleich.
In der embryonalen Leber fanden Mendel und Saiki[13]) nur wenig Amylase.

Sehr wichtig ist für die Beurteilung der Rolle der Leberamylase die Frage, ob Glykogen und Amylase in der Leberzelle räumlich getrennt sind. Diese Frage ist neuerdings von Kerner und Lesser[12]) wieder aufgenommen

[1]) Hoppe-Seyler, Pflüg. Arch. 14, 394; 1877.
[2]) Biedermann und Moritz, Pflüg. Arch. 75, 1; 1899. — 73, 247; 1898.
[3]) v. Wittich, Pflüg. Arch. 7, 28; 1873.
[4]) Claude Bernard, C. r. 85, 519, 1877.
[5]) Pavy, Jl of Physiol. 22, 391; 1898.
[6]) Tebb, Jl of Physiol. 22, 423; 1898.
[7]) Pick, Hof. Beitr. 3, 63; 1902.
[8]) Dastre, Soc. Biol. 53, 32; 1902.
[9]) Macleod und Pearce, Amer. Jl of Physiol. 27, 341; 1916.
[10]) Die Schwankungen von dem Mittelwert fand Starkenstein (1910) recht gross, im Gegensatz zu Wohlgemuth $D_{24}^{38°}$ = 5–12,5).
[11]) Shigenobu Kuriyama, Jl Biol. Chem. 33, 193; 1918.
[12]) Kerner und Lesser, Biochem. Zs 102, 284; 1920. — Lesser, ebenda 294 und 304.
[13]) Mendel und Saiki, Amer. Jl of Physiol. 21, 64; 1908.

worden, und zwar mit dem Resultat, dass die Amylase aus der Leber des Frosches mit Ringerlösung herausgespült werden kann. Adrenalin soll nach Lesser die räumliche Trennung von Glykogen und Amylase in der Leber aufheben.

Da die Amylase offenbar für den Zuckerhaushalt im Tierkörper eine entscheidende Rolle spielt, so hat sie beim Studium der Störungen des Zuckerumsatzes, in erster Linie bei Diabetes, schon oft Beachtung gefunden, wenn auch eine abschliessende Untersuchung über dieses wichtige Kapitel noch fehlt.

Bainbridge und Beddard[1]) haben auch bei Diabetikern Amylase in der Leber nachweisen können. Schlesinger[2]) fand bei Diabetes keine Abweichung vom normalen Amylasegehalt.

Die Angabe Bangs, dass unmittelbar nach dem Zuckerstich beim Kaninchen der Amylasegehalt steigt, ein Maximum erreicht und dann wieder zurückgeht, konnte Starkenstein nicht bestätigen.

Das Resultat von Zegla[3]), dass bei pankreasdiabetischen Katzen die Leberamylase vermindert ist, bedarf vielleicht noch einer Nachprüfung, ebenso der Befund des gleichen Autors, dass bei Phlorizin-Diabetes der Kaninchen eine Vermehrung der Leberamylase eintritt[4]).

Bei Adrenalinglukosurie sind noch keine bestimmten Resultate bezüglich Amylase erhalten worden, offenbar sind ev. Effekte sehr schwach.

Darstellung. Ausgangsmaterial ist hier nicht das Sekret, sondern das entblutete Gewebe des Organs. v. Wittich extrahierte getrocknete Leber mit Glyzerin, Seegen und Kratschmer benutzten frische Leber, Pavy (l. c.) verrieb fein verteiltes frisches Lebergewebe von Kaninchen mit viel absolutem Alkohol und liess die Masse 6 Monate stehen. Dann wurde sie mit Äther gewaschen, getrocknet und gepulvert. Dieses Pulver, in 1 %iger Kochsalzlösung aufgeschlemmt, erwies sich nach 4 Stunden bei 46° deutlich diastatisch wirksam.

Tebb extrahierte das Enzym aus getrockneter Leber mittels 5%iger Natriumsulfatlösung und entfernte das Salz durch Dialyse. Pick behandelte das fein verteilte frische Lebergewebe mit Alkohol und nahm die Extraktion des Pulvers mit physiologischer Kochsalzlösung vor.

Wohlgemuth (1909) und Zegla arbeiteten mit Presssaft, der nach Verreiben mit Quarzsand durch Auspressen bei 100—200 Atm. gewonnen war. Bang benutzte eine Aufschwemmung von frischem Leberbrei in physiologischer Kochsalzlösung. Hierzu hebt Starkenstein (l. c.) mit Recht hervor, dass das Arbeiten mit frischen tierischen Organen für quantitative Vergleiche des Amylasegehaltes von Organen ungeeignet ist.

[1]) Bainbridge und Beddard, Biochem. Jl 2, 89; 1907.

[2]) Schlesinger, Deutsche med. Wochenschr. 34, 593; 1908. — Siehe auch Bang, Hofm. Beitr. 10, 320; 1907.

[3]) Zegla, Biochem. Zs 16, 111; 1909.

[4]) Siehe hierzu Wohlgemuth und Benzur, Biochem. Zs 21, 460; 1909.

Empfehlenswert für viele Untersuchungen ist offenbar die Herstellung eines Organpulvers nach der Methode von Wiechowski (vgl. Bd. I, S. 7), die darin besteht, dass man den Leberbrei in dünner Schicht auf Glasplatten im Luftstrom schnell trocknet.

Aziditätsbedingungen sind für die Leberamylase nicht besonders geprüft worden; indessen hat man allen Grund anzunehmen, dass die verschiedenen Organamylasen in dieser Hinsicht übereinstimmen.

Was die Neutralsalzwirkung betrifft, so hat Starkenstein die Leberamylase durch Dialyse vollständig inaktivieren können, und hat auch versucht, eine Konzentrationsfunktion des Kochsalzes zu ermitteln; allerdings eignet sich hierzu die Jodmethode wenig.

Auch bezüglich des Temperatur-Einflusses kann wohl auf die Speichel- und Pankreasamylase verwiesen werden; nur ein Befund von Pavy verdient eigens Erwähnung, dass die diastatische Wirkung des Leberpulvers durch Kochen mit absolutem Alkohol nicht aufgehoben wird.

5. Muskeln

enthalten ebenfalls stets Amylase, und zwar wie Mendel und Saiki[1]) bei einer Untersuchung am Schwein fanden, bereits vom Embryonalzustand an, während sonstige Organe verschiedener Tiere gewöhnlich mit zunehmender Entwickelung reicher an Enzym werden (Pugliese u. a.).

Nach Nasse u. a. geht ein solches Enzym in den Muskelsaft über, wodurch eine ältere Untersuchung Halliburtons[2]) bestätigt wird.

Die diastatische Wirkung der Muskeln bei Diabetes mellitus ist von Bainbridge und Beddard[4]) untersucht worden.

6. Niere, Herz[5]) und andere Organe.

Den relativen Amylasegehalt der Organe bei verschiedenen Tieren haben Wohlgemuth und Benzur[6]) (Kaninchen) sowie Hirata[7]) gemessen.

Wohlgemuth und Benzur (l. c.) fanden, dass die diastatische Wirkung der Niere bei Phlorizinvergiftung und bei Adrenalinglukosurie steigt[8]), während bei der Leber und im Muskel keine diesbezügliche Veränderung eintrat.

Nach Kisch[3]) ist besonders der Herzmuskel reich an Amylase. Die Wirkung des Muskelpresssaftes hat schon Wohlgemuth studiert.

---

1) Mendel und Saiki, Amer. Jl Physiol. 21, 64; 1908.
2) Halliburton, Jl Physiol. 8, 182; 1887.
3) Kisch, Hofm. Beitr. 8, 210; 1906.
4) Bainbridge und Beddard, Biochem. Jl 2, 89; 1907.
5) Berblinger, Zieglers Beitr. pathol. Anat. 53, 155; 1912.
6) Wohlgemuth und Benzur, Biochem. Zs 21, 460; 1909.
7) Hirata, Biochem. Zs 27, 385; 1910.
8) Siehe auch Pavy, Brodie und Siau, Jl of Physiol. 29, 407; 1903.

Nach Tschernoruzki[1]) soll durch intravenöse Injektion von Nukleinsäure (Hefenukleinat Merck) die enzymatische Wirkung der Organe erhöht werden, und zwar die diastatische am meisten. „Im Gehirn waren die Werte für die Amylase 400 mal, in den Lungen 250 mal höher.“

In der Schilddrüse und im Hoden verschiedener Tiere fanden E. Fischer und Niebel[2]) Amylase, in den Nebennieren Croftan[3]).

Kito[4]) schliesst aus seinen Versuchen an Meerschweinchen, dass die Plazenta für Amylase durchlässig ist (vergl. auch Teil I, S. 91).

7. Blut.

Das von Claude Bernard nachgewiesene Vorkommen der Amylase im Blutserum wurde durch Bial, Pick, Ascoli und Bonfanti[5]) näher studiert. Menschenblut ist verhältnismässig arm an Amylase, auch schwankt der Enzymgehalt offenbar stark. Bedeutend grössere Mengen hat Wohlgemuth (l. c.) bei Meerschweinchen und Hunden gefunden.

Eingehende Untersuchungen über physiologische Einflüsse verdankt man auch Macleod und Pearce[6]).

Nach Schlesinger[7]) wird die Amylase bei höheren Tieren im Pankreas gebildet und durch das Blut auf die übrigen Teile des Körpers verteilt; indessen kommen für die Amylasebildung auch noch andere Organe, besonders die Leber, in Betracht[8]). Wahrscheinlich ist, dass die im Blut zirkulierende Amylase sich auf dem Weg zu den Nieren befindet, wo sie ausgeschieden wird (Carlson und Luckhardt[9]), King[10])).

A. J. Carlson und seine Mitarbeiter[11]) haben die Beziehung des Amylasegehaltes des Speichels und des Blutes genau verfolgt.

Der Amylasegehalt des Kaninchenserums (62,5 nach Wohlgemuths Skala) wird durch Schilddrüsenaufnahme nicht geändert[12]).

Bei Meerschweinchen fand Schirokauer (1910) den Amylasegehalt des Blutes während der Gravidität abnorm hoch.

Was pathologische Bedingungen betrifft, so machen sich auch hier die erwähnten grossen Schwankungen geltend. So fanden Myers und Kilian[13])

---

1) Tschernoruzki, Biochem. Zs 36, 363; 1911.
2) E. Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. d. Wiss. S. 75, 73; 1896.
3) Croftan, Pflügers Arch. 90, 285; 1902
4) Kito, Amer. Jl Physiol. 48, 481; 1919.
5) Ascoli und Bonfanti, H. 43, 156; 1904.
6) Macleod und Pearce, Amer. Jl Physiol. 25—29; 1910—12.
7) Schlesinger, Deutsche med. Wochenschr. 34, 593; 1908.
8) Gould und Carlson, Amer. Jl Physiol. 29, 165; 1911.
9) Carlson und Luckhardt, Amer. Jl Physiol. 23, 148; 1908.
10) King, Amer. Jl Physiol. 35, 301; 1914.
11) A. J. Carlson und Mitarbeiter, Amer. Jl of Physiol. 1907—1909.
12) Kuriyama, Jl Biol. Chem. 33, 193; 1918.
13) Myers und Kilian, Jl Biol. Chem. 29, 179; 1917.

bei zahlreichen Fällen von Nephritis den Amylasegehalt des Blutes auf das doppelte bis dreifache des normalen gesteigert, dagegen konnten Lewis und Mason[1]) zwar Erniedrigungen in der Amylasewirkung feststellen, aber keinen Zusammenhang mit der Art der Nierenerkrankung.

Besonders naheliegend war es, bei Diabetes mellitus Beziehungen zwischen der Höhe des Blutzuckergehaltes und der diastatischen Aktivität zu suchen (Foster 1867). Während Myers und Kilian (l. c.) bei 13 Diabetesfällen eine Amylasewirkung fanden, welche die normale um das 2—5fache übertrifft[2]) und nach ihren Ergebnissen eine Beziehung zur Menge des Blutzuckers annehmen, liefern die Ergebnisse von Bang und die neueren von Lewis und Mason keinerlei Anhaltspunkte dafür.

Auch konnte Wohlgemuth keine Veränderung bei Adrenalin- und Phlorizindiabetes nachweisen.

Ungeändert bleibt nach Schirokauer und Wilenko[3]) die Blut- und Leberamylase auch im Fieber.

8. Serum, Lymphe, Milch, Zerebrospinalflüssigkeit.

Diese Flüssigkeiten sind besonders von Röhmann und Bial[4]), sowie Carlson und Luckardt (l. c.) untersucht worden, Zerebrospinalflüssigkeit wurde von Panzer[5]), Milch von Wohlgemuth[6]) untersucht. Nach Sato[7]) soll durch 100 ccm Kuhmilch bei 40° in 30 Min. 5—21 mg Stärke, in 24 Stunden 10—37 mg Stärke gespalten werden.

Eine Amylase findet sich nach Roger (Soc. Biol. 64) auch im Hühnerei und soll teilweise in Äther löslich sein (?).

9. Harn.

Menschlicher Harn soll eine ziemlich gleichmässige Amylasewirkung zeigen[8]). Lindemann[9]) fand die Wirksamkeit in der Wohlgemuthschen Einheit D = 15—45. Männer scheiden nach Wohlgemuth[10]) mehr Amylase aus als Frauen.

Wesentlich beeinflusst wird der Amylasegehalt des Harns von der Durchlässigkeit der Nieren[11]). Hirata[12]) fand bei experimenteller, durch

---

[1]) Lewis und Mason, Jl Biol. Chem. 44, 455; 1920.
[2]) Lépine und Barral hatten 1891 eine Verminderung der Amylase gefunden.
[3]) Schirokauer und Wilenko, Zs klin. Med. 70, 257; 1910.
[4]) Röhmann und Bial, Pflüg. Arch. 52—55.
[5]) Panzer, Wiener klin. Wochenschr. 12, 805; 1899.
[6]) Wohlgemuth und Strich, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. 25, 520; 1910.
[7]) Sato, Biochem. Jl 14, 120; 1920.
[8]) Pariset, Soc. Biol. 63, 614; 1907.
[9]) Lindemann, Zs klin. Med. 75, 58; 1912.
[10]) Wohlgemuth, Zs Urologie 5, 801; 1911.
[11]) Rosenthal, Deutsche med. Wochenschr. 37, 923; 1911.
[12]) Hirata, Biochem. Zs 28, 23; 1910.

Sublimat-, Chrom- und Uranvergiftung an Kaninchen hervorgerufener Nephritis eine Abnahme der Amylase im Urin. Man könnte hier an eine Inaktivierung des Enzyms durch die in den Harn übergetretenen Gifte denken, indessen wurde gleichzeitig eine Zunahme der Amylase im Blut konstatiert. Beziehungen zur Nephritis besprechen auch Wynhausen[1]) und v. Benczúr (1910).

Bei Diabetes ist nach übereinstimmendem Befund zahlreicher Beobachter die Amylasewirkung des Harns stark herabgesetzt (Lépine, Wohlgemuth, Rosenthal (l. c.), Marino[2]) u. a.). Indessen ist hier aber immer in Betracht zu ziehen -- besonders bei Diabetes insipidus —, dass der Nachweis der Harnenzyme im krankhaft vermehrten Harn durch die grosse Verdünnung wesentlich erschwert wird (Schaumberg; Wolpe[3])).

Tierische Anti-Amylasen.

Angaben über die Immunisierung von Kaninchen gegen Pankreasamylase findet man bei Ascoli und Bonfanti (H. 43).

B. Pflanzliche Amylasen.

Die Gegenwart eines stärkeverzuckernden Enzyms im Malz wurde 1833 von Payen und Persoz und bald darauf von Saussure entdeckt. Die Verzuckerung der Stärke durch Malz hatten bereits 1785 Irvine und 1815 Kirchhoff beschrieben.

1. Amylasen der Phanerogamen.

Vorkommen: Vor allem sind hier die Samen der Gräser zu nennen, in erster Linie der Gerste, welche als Malz bekanntlich die Amylase zu den technisch wichtigen Verzuckerungen liefert, ferner von Roggen, Weizen, Hafer, Mais, Hirse, Reis (Chrzaczsz, Zs Spir.-Ind. 32, 1909). Besonders gross ist die Wirkung der keimenden Samen.

Die Bildung der Amylase in dem Samen hängt mit dem Keimprozess offenbar aufs engste zusammen. Nach Brown und Morris u. a. wird das Enzym durch den Embryo in das ihm benachbarte Endosperm ausgeschieden.

„Wenn man die Entwickelung des Embryo in dem keimenden Samen mit Hilfe des Mikroskops verfolgt" — schreibt Green, einer der besten Kenner dieses Gebietes — „so kann man zu einer Zeit, zu der das primäre Würzelchen eine Länge von etwa 2 mm erreicht hat, Veränderungen in den stärkeführenden Zellen des Endosperms beobachten." Dieses aus dem sog. Scutellum des Embryos sezernierte Enzym bezeichnet Green nach dem Vorgang von Brown und Morris[4]) als Sekretionsdiastase im Gegensatz zur Translokationsdiastase des Endosperms und aller vegetativen Organe.

[1]) Wynhausen, Berliner klin. Wochenschr. 47, 2107; 1910.
[2]) Marino, Deutsches Arch. klin. Med. 103, 325; 1911.
[3]) Wolpe, Berliner klin. Wochenschr. 58, 101; 1921. Daselbst Literatur.
[4]) Brown und Morris, Jl Chem. Soc. 57, 505; 1890.

Es scheint nicht, dass sich die eben erwähnte Zweiteilung der Amylasen aufrecht erhalten lässt. Indessen kann auf diese in das botanische Gebiet übergreifenden Fragen hier nicht näher eingegangen werden, vielmehr sei auf die bekannte „Biochemie der Pflanzen“ von Czapek (2. Aufl. Jena 1920) Bd. 1, I. Teil, Abschn. 1—4 verwiesen.

Ausser in den genannten Samen findet sich Amylase aber auch in Pollenkörnern (Green), Knollen (z. B. Kartoffelknollen), Wurzeln, Rüben, Blättern, Rinden, überhaupt wohl in allen pflanzlichen Organen und Säften, welche Stärke enthalten und in welchen ein Stärke-Umsatz stattfindet. Es würde deswegen zu weit führen, hier alle Befunde über Vorkommen zu zitieren, und es sei deswegen auf das Werk von Czapek, 2. Aufl., Bd. 1 verwiesen. Eine interessante Studie über die Jahres-Variationen der Amylasewirkung in grünen Blättern hat K. Sjöberg (1921) verfasst.

Darstellung: Unter den zahlreichen Arbeiten, in welchen auch die Darstellung der Amylase erwähnt wird und die man bei Sherman[1]) ziemlich vollständig zitiert findet, können hier nur einige wesentliche Methoden angeführt werden.

Lintner[2]) extrahierte 1 Tl. Gerstengrünmalz 24 Std. mit 2—4 Tln. 20%igen Alkohols und fällte den Extrakt mit dem 2—2,5 fachen Volumen abs. Äthers. Der sich rasch absetzende Niederschlag wird durch Dekantieren von der Flüssigkeit getrennt und mit absolutem Alkohol verrieben, nach Filtration mit abs. Alkohol gewaschen, mit Äther zerrieben, abgesogen und im Vakuum über H_2SO_4 getrocknet. Das so erhaltene gelblich-weisse Pulver hält stets noch geringe Mengen von Alkohol zurück. Ausserdem enthielt das Rohpräparat 16% Asche, hauptsächlich Calciumphosphat. Durch wiederholtes Umfällen und Dialysieren wurde eine gewisse Reinigung, besonders eine Verminderung des Aschengehaltes bis auf 5% erzielt. — Später hat Lintner auch eine Darstellung aus Weizenmalz beschrieben; ähnliche Methoden hat Wróblewski[3]) angewandt.

Osborne und Campbell[4]), deren Angaben sich durch Genauigkeit auszeichnen, benutzten die Ausfällung durch Ammoniumsulfat zur Darstellung der Amylase.

Sherman[5]) ist mit seinen Mitarbeitern hinsichtlich der Reinigung der Amylase am weitesten gekommen. Er stellt sein Rohpräparat folgendermassen dar: Gemahlenes Malz wird etwa 2 Stunden mit der 2,5 fachen Menge Wassers, verdünnten Alkohols oder sehr verdünnter Phosphorsäure bei ca. 10° extrahiert. Der filtrierte Extrakt wird 1—2 Tage durch Kollodiumsäcke gegen kaltes Wasser dialysiert und hierauf mit Alkohol oder Azeton ausgefällt bis die Alkohol-Konzentration etwa 70% erreicht.

[1]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1617; 1913.
[2]) Lintner, Jl prakt. Chem. N.F. 34, 386; 1886.
[3]) Wróblewski, H. 24, 173 und Chem. Ber. 30, 2289; 1897.
[4]) Osborne und Campbell, Jl Amer. Chem. Soc. 18, 536; 1896.
[5]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1617; 1913.

In der Regel wurde durch diese Methodik ein Präparat erhalten, dessen Wirksamkeit grösser ist als 400 der Shermanschen Skala (= 600 Lintner-Einheiten = 15 Sf. unserer Zählung). Das beste Fünftel der Präparate zeigte 1200—1540 Sherman-Einheiten (= ca. 53 Sf.). An diesen ergab die Stickstoffbestimmung[1]) nach van Slyke:

Stickstoff	Wirksamkeit in Sf.	13	34
	C	D	E
NH_3	7,8	7,3	7,9
Melanin	4,1	3,9	5,6
Arginin	14,5	13,1	14,2
Histidin	4,6	6,5	5,4
Lysin	7,5	6,7	5,5
Cystin	4,0	4,0	4,9
Amino-N des Filtrats	55,3	53,9	52,4
Nicht-N des Filtrats	3,5	4,3	4,5

Bei weiteren Reinigungsversuchen von Sherman und Schlesinger[2]) wurde der im Vakuum eingeengte Malzextrakt zuerst ausgiebig dialysiert und dann mit Ammoniumsulfat gesättigt, wodurch eine inaktive Fällung entsteht. Die Lösung wurde wieder dialysiert, von einem Niederschlag abdekantiert und unterhalb 15° mit reinem kalten Alkohol versetzt, bis dessen Gehalt 50 bzw. 65 % betrug. Durch dieses Verfahren wurde zwar eine höhere mittlere Wirksamkeit der Präparate erzielt, dagegen stieg die maximale Wirksamkeit nicht über 1570 Sherman-Einheiten = 60 Sf. Diese aktivsten Präparate enthielten 15,3 % N.

Sherman und Schlesinger haben ihre hochaktiven Malz-Amylasen eingehend mit ihren Pankreas-Amylase-Präparaten verglichen[3]). Sie kommen dabei zu folgenden Ergebnissen:

Beide Amylasen sind amorphe, stickstoffhaltige Substanzen, löslich in Wasser und in 50%igem Alkohol, unlöslich in konz. Alkohol oder Azeton. Beide zeigen die typischen Protein- (Millon-, Xantoprotein-, Tryptophan- und Biuret-)Reaktionen. Beide enthalten 15—16 % N. Untersuchung nach van Slyke siehe S. 99. Beim Erhitzen geben beide ein koaguliertes Albumin und eine Proteose oder ein Pepton.

Aziditätsbedingungen: In einer vorläufigen Mitteilung haben Verf. und Svanberg[4]) eine Aziditätskurve für Malzamylase angegeben (Fig. 13). Die kleinen Vierecke sind die Dissoziationsreste, welche sich aus einer Dissoziationskonstante von $10^{-7,75}$ ergeben (siehe die folgende Tabelle). In der

[1]) Sherman und Gettler, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1790; 1913.
[2]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 643; 1915.
[3]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 1305; 1915.
[4]) Euler und Svanberg, H. 112, 193; 1920.

Fig. 14 ist die Dissoziationsrestkurve gezeichnet und die experimentellen Punkte sind markiert.

Relative Dissoziationsreste einer Säure von $K = 10^{-7,75}$.

pH	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8	8,5	9	9,5
Dissoziationsrest	100	99,4	98,4	94,9	85	64	36	15	5,3	1,75

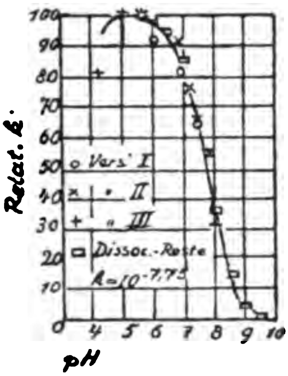


Fig. 13.

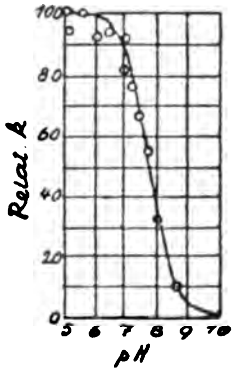


Fig. 14.

Die rechte Seite der Kurve ist also in diesem Falle besser als bei der Speicheldiastase mit Michaelis' Theorie vereinbar[1]), nach welcher das Enzym bzw. die Verbindung Enzymsubstrat als amphoterer Elektrolyt die Aziditätsbedingungen bestimmt. Vergl. hierzu I. Teil, S. 111 ff.

Was die Ergebnisse früherer Autoren betrifft, so stützt sich der erste exakt angegebene pH-Wert, nämlich der von Sörensen, auf Angaben Fernbachs. Adler[2]) fand ein Optimum zwischen 4,7 und 5,15. Sherman und Thomas[3]), welche als Optimum der Verzuckerung pH = 4,2 bis 4,6 angeben, haben einzelne Punkte elektrometrisch gemessen; eine pH-Kurve geben Sherman, Thomas und Baldwin[4]) in Fig. 11 an; danach liegt das Optimum bei pH = 4,4—4,5. A. Hahn und Harpuder[5]) finden als pH-Optimum 4,7.

Ernström findet das Optimum in Gegenwart von Natriumazetat als Puffer zwischen 4,7 und 5,0.

Während das Aziditätsoptimum des Ptyalins durch Salzzusätze verschoben wird[6]), zeigt die Malzamylase nach Hahn und Harpuder ihr Wirkungsoptimum bei Zusatz von Chlorid, Bromid, Nitrat und Sulfat an gleicher

[1]) Michaelis und Pechstein, Biochem. Zs 59, 77; 1914.
[2]) Adler, Biochem. Zs 77, 146; 1916.
[3]) Sherman und Thomas, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 623; 1915.
[4]) Sherman, Thomas und Baldwin, Jl Amer. Chem. Soc. 41, 231; 1919.
[5]) A. Hahn und Harpuder, Zs f. Biol. 71, 287 und 302; 1919.
[6]) Hahn (l. c. S. 17) glaubt, dass die Beeinflussung der Wirksamkeit des Enzymes durch Salze aus der Beeinflussung seines kolloiden Zustandes zu erklären ist.

Stelle, wie in reinem Azetatpuffer. „Die Wirkung des Salzzusatzes bei den einzelnen Reaktionen (Aziditäten) gibt hier ohne weiteres die Erklärung, wie folgendes Schema für Puffer n/50 und Salz n/25 zeigt:

	alkalisch			Optimum ohne Salz	sauer		
Azetatpuffer allein	1	2	3	[4]	5	6	7
Wirkung der Salze	+	+	+	±	—	—	—

Im Optimum selbst (Puffer 4) ist das Salz wirkungslos[1]). Bei sauren Reaktionen hemmt der Salzzusatz, bei alkalischeren fördert er.“ Vgl. hierzu S. 90. Hahn hebt noch zusammenfassend hervor, dass durch Hinzufügen von Alkalisalzen zur Amylase „die elektrische Natur des Enzyms von Grund auf verändert wird, ohne dass dies in der Wirkungsweise wesentlich zum Ausdruck käme“. Die weitere kritische Prüfung dieses Ergebnisses ist natürlich für unsere allgemeinen Anschauungen über die Wirkungsweise von Enzymen von wesentlicher Bedeutung.

Im allgemeinen scheint Malzamylase von Kochsalz sehr viel weniger aktiviert zu werden als Ptyalin und die übrigen tierischen Amylasen.

Aktivatoren. Als anorganische Aktivatoren werden ausser den oben genannten neutralen Alkalisalzen noch die Salze des Vanadins und Aluminiums[2]) sowie des Eisens und Mangans[3]) angegeben. Bezüglich des Eisenchlorids haben die Messungen von U. Olsson keine Bestätigung erbracht (siehe unten). Weitere Prüfungen sind erwünscht.

Auch der wiederholt behauptete günstige Einfluss mancher organischen Aktivatoren, so z. B. derjenige von Aminosäuren (siehe auch unter Paralysatoren) dürfte auf Aziditätsbeeinflussung zurückzuführen sein. Ob beim Asparagin spezifische Wirkungen vorliegen, bleibt zu untersuchen.

Chinin soll (als basisches Salz) nach Gerber[4]) ein wenig aktivieren.

Paralysatoren.

Anorganische Stoffe. Die ersten brauchbaren Ergebnisse verdankt man Kjeldahl. In einer eingehenden Untersuchung hat U. Olsson neuerdings die Wirkung von Jod, von NaF, von mehreren Schwermetallsalzen und von Salzen der Molybdän- und Wolframsäure festgestellt[5]). Wie aus seinen Versuchen hervorgeht, schreitet die Einwirkung verschiedener Paralysatoren mit der Zeit fort, wenn man zunächst den Paralysator mit der Enzymlösung in Berührung bringt. Über die erforderlichen Zeiten gibt folgende Tabelle Aus-

[1]) Dieses Resultat wird durch die Versuche Ernströms bestätigt.

[2]) Effront, Die Diastasen, S. 126. — Soc. Biol. 57, 234; 1904.

[3]) Gigon und Rosenberg, Skand. Arch. Physiol. 20, 423; 1908.

[4]) Gerber, Soc. Biol. 71, 208; 1911.

[5]) Über die Wirkung von Jod siehe auch Berczeller und E. Fodor, Biochem. Zs 84, 112; 1917; Über die Wirkung von NaF auf Kartoffelamylase siehe Doby, Biochem. Zs 67, 166; 1914.

kunft. Die 2. Spalte der Tabelle gibt die molekular-normale Konzentration des Giftes in der substratfreien Lösung an, bezogen auf 1 mg organische Trockensubstanz des Enzyms.

Gift	Molekular-normale Konzentration des Giftes	Einwirkungsdauer (Inkubationszeit)	Verminderung der Aktivität des Enzyms in %
Jod	$1{,}39 \cdot 10^{-7}$	10 Min., 80 Min., 21 Std.	48, 56, 60
Phenylhydrazin . . .	$4{,}81 \cdot 10^{-4}$	10 Min., 40 Min., 6 Std.	72, 77, 90
Hydroxylamin . . .	$7{,}98 \cdot 10^{-4}$	30 Min., 16, 23, 43 Std.	8, 65, 67, 83
Semicarbazid . . .	$4{,}45 \cdot 10^{-5}$	10 Min., 4, 32 Std.	3, 3, 31
Na_2SO_3	$9{,}03 \cdot 10^{-4}$	10 Std.	64
Cyankalium	$2{,}14 \cdot 10^{-4}$	10 Min., 20 Std.	33, 58
H_4N-Molybdat . . .	$3{,}04 \cdot 10^{-3}$	15 Min., 3, 9, 22, 52 Std.	6, 6, 22, 38, 67
Na Wolframat . . .	$6{,}03 \cdot 10^{-4}$	10 Min., 5, 23 Std.	13, 72, 100
Natriumfluorid . . .	$3{,}0 \cdot 10^{-3}$	5 Std.	3
Leucin	$5{,}48 \cdot 10^{-3}$	26 Std.	5
Alanin	$2{,}80 \cdot 10^{-2}$	30 Min.	100

Für den zeitlichen Verlauf der Vergiftung liefert die Fig. 15 ein Beispiel.

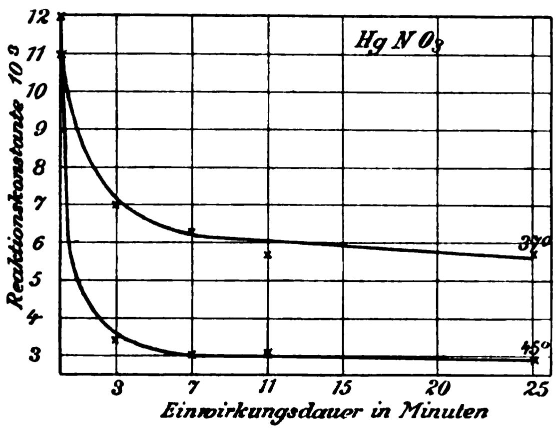


Fig. 15.

Etwa die Hälfte der normalen Aktivität der Malzamylase wird demgemäss erreicht, wenn im stärkehaltigen Reaktionsgemisch die obigen Substanzen in folgenden Konzentrationen vorhanden sind.

Gift	Konzentration	Gift	Konzentration
Jod	$1{,}74 \cdot 10^{-8}$	H_4N-Molybdat . .	$3{,}80 \cdot 10^{-4}$
Phenylhydrazin .	$6{,}01 \cdot 10^{-5}$	Na-Wolframat .	$7{,}54 \cdot 10^{-5}$
Hydroxylamin . .	$9{,}98 \cdot 10^{-5}$	Natriumfluorid .	$3{,}75 \cdot 10^{-4}$
Semicarbazid . .	$5{,}56 \cdot 10^{-6}$	Leucin	$6{,}85 \cdot 10^{-4}$
Na_2SO_3	$1{,}13 \cdot 10^{-4}$	Alanin	$3{,}50 \cdot 10^{-3}$
Cyankalium . . .	$2{,}68 \cdot 10^{-5}$		

Die folgende Tabelle U. Olssons gibt neben den Giftkonzentrationen (im Reaktionsgemisch) in einer 3. Spalte noch die Verminderung der Aktivität des Enzyms in Prozenten an (bei den betr. Stoffen ist die Inkubationszeit sehr klein).

Gift	Konzentration	Aktivitäts-Verminderung in %
Uranylsulfat . . .	$6{,}44 \cdot 10^{4}$	57
Eisenchlorid . . .	$6{,}16 \cdot 10^{5}$	11
Zinksulfat	$8{,}8 \cdot 10^{-2}$	13
Mercuronitrat . .	$1{,}78 \cdot 10^{-7}$	50
Mercurochlorid . .	$2{,}13 \cdot 10^{-7}$	50
Mercurichlorid . .	$6{,}04 \cdot 10^{8}$	61
Formaldehyd . . .	$6{,}87 \cdot 10^{-3}$	50

Oligodynamische Wirkungen von Metallen. Dass diese Wirkungen auf den minimalen Mengen von Metallionen bzw. Metallhydroxyden beruhen, welche in die wässrige Umgebung des Metalls übergehen, braucht wohl kaum eigens erwähnt zu werden; siehe hierzu Baumgarten und Luger sowie H. Langer (Wien. klin. Woch. 30); ferner Falta und Richter-Quittner (Biochem. Zs 115, 89; 1921).

Organische Stoffe. Man findet in den obigen Tabellen von Olsson auch einige typische organische Gifte[1]).

Alkaloide sollen nach Goebel[2]) im allgemeinen nur wenig schädigen; dies gilt speziell bezüglich Strychnin nach Kjeldahl und bezüglich Akonitin nach Bywaters und Waller[3]).

Dass Äthylalkohol bis zu 50% nur wenig schädigt, geht aus den Arbeiten Shermans hervor.

Phenole sollen etwas hemmen. Siehe auch 1. Teil, S. 151 u. ff.

Kinetik.

Die zahlreichen Untersuchungen über die Kinetik der Stärkespaltung haben bis jetzt noch zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt. Dies hat seinen Grund teils in der Inhomogenität des Substrates, besonders aber darin, dass es sich hier nicht, wie etwa bei der Hydrolyse eines Esters oder einer Biose, um eine einfache Spaltungsreaktion handelt, sondern dass der Weg von der Stärke bis zur Maltose über eine Reihe von Zwischenprodukten führt, welche wir erst in allerletzter Zeit näher kennen gelernt haben. An der Bildung dieser Zwischenprodukte sind vermutlich mehrere Enzyme beteiligt, deren näheres Studium noch aussteht. Schon jetzt können wir aber annehmen, dass das Enzym, welches die Verflüssigung des Stärkekleisters bewirkt, ver-

[1]) Die älteste Untersuchung über Vergiftung der Amylase durch Formaldehyd stammt von O. Loew (1888). Siehe auch Berczeller und E. Fodor, Biochem. Zs 84.

[2]) Goebel, Biochem. Zbt. 4, 1356; 1905 (Orig. russisch).

[3]) Bywaters und Waller, Jl of Physiol. 40 (45) 1910.

schieden ist von dem Katalysator der Verzuckerung. Wie Karrer[1]) richtig hervorhebt, haben wir es beim Stärkeabbau zunächst mit einer Depolymerisation zu tun und dann mit eigentlichen hydrolytischen Reaktionen, welche von den Amylosen zur Maltose[2]) führen. Was bei kinetischen Untersuchungen bis jetzt im allgemeinen verfolgt wurde, ist eine — je nach der gewählten Methodik mehr oder weniger vollständige — Summe von Folgereaktionen. Dass demgemäss der Anschluss an die für einfache monomolekulare Reaktionen geltenden Gesetze und Beziehungen nicht gefunden wurde, kann nicht auffallen. Andererseits hat es unter den erwähnten Umständen nur einen bedingten Wert, empirische Formeln kennen zu lernen, welche sich den Versuchsergebnissen anschliessen. Ganz entbehren lassen sich solche Formeln nicht, da die Angabe der Wirksamkeit von Amylase- (Diastase-) -Präparaten sich auf kinetische Beobachtungen gründen muss.

Der gegenwärtige Stand der Forschung ergibt sich etwa aus Folgendem:

Es seien zunächst diejenigen Arbeiten erwähnt, welche sich mit den Wirkungsbedingungen der Malzamylase und mit dem zeitlichen Verlauf der Verzuckerung beschäftigen; auf die Verfahren, welche nur bezwecken, den Wirkungswert von Malz und Malzextrakten zu finden, kommen wir S. 134 u. ff. zurück.

Die ersten quantitativen Versuche über den Verlauf und die Bedingungen der diastatischen Wirkung des Malzextraktes verdankt man Kjeldahl[3]).

Brown und Glendinning[4]) haben sehr exakte systematische Versuche darüber angestellt, ob die Verzuckerung der löslichen Stärke sich der Formel für monomolekulare Reaktionen anschliesst.

Die folgende, ihrer Arbeit entnommene Tabelle bezieht sich auf die Verzuckerung einer 3%igen Stärkelösung durch 0,25 ccm Malzextrakt auf 100 ccm Lösung. Temperatur 51—52°.

Minuten	$1-x$	$k \cdot 10^4$	$k_1 \cdot 10^4$	Minuten	$1-x$	$k \cdot 10^4$	$k_1 \cdot 10^4$
10	0,8916	50	47	80	0,2615	73	51
20	0,7750	55	50	90	0,2200	73	50
30	0,6650	59	50	100	0,1850	73	50
40	0,5645	62	51	110	0,1500	75	50
50	0,4650	65	52	120	0,1200	76	50
60	0,3850	69	52	140	0,0780	79	50
70	0,3200	71	51	160	0,0500	81	49

[1]) Karrer, Nägeli, Hurwitz und Wälti, Helv. 4, 678; 1921.

[2]) Die Behauptung Lintners, dass bei der Spaltung der Stärke Isomaltose entstehe, kann nunmehr durch die mehrfachen Nachprüfungen besonders von Ling und Baker sowie von Brown und Morris (Jl Chem. Soc. 67) als widerlegt gelten.

[3]) Kjeldahl, Medd. Carlsberg-Lab. 1, 1879. — Zs ges. Brau. 1880.

[4]) Brown und Glendinning, Jl Chem. Soc. 81, 388; 1902.

3%ige Stärkelösung mit 1 ccm Malzextrakt auf 100 ccm Lösung:

Minuten	1 — x	$k \cdot 10^4$	$k_1 \cdot 10^4$
10	0,92	37	35
20	0,84	39	36
40	0,69	40	34
60	0,56	42	34
70	0,49	44	34

Die Konstante k der monomolekularen Formel steigt stark an, und das gleiche ist auch in den übrigen drei Tabellen der genannten Autoren der Fall. Brown und Gendinning haben die naheliegende Annahme geprüft, dass die beobachtete Steigerung der Konstanten davon herrührt, dass die zu Beginn der Reaktion entstehenden Dextrine leichter gespalten werden als das ursprüngliche Substrat; ihr Versuch mit Ausgangsmaterial, das verschieden weit vorgespalten war, hat keine Stütze für obige Annahme geliefert.

Für den Koeffizienten k_1 der Formel $k_1 = \frac{1}{t} \ln \frac{a+x}{a-x}$ finden sie eine angenäherte Konstanz.

V. Henri[1]) kam bald darauf zu einem Ergebnis, welches von demjenigen der beiden englischen Autoren insofern abwich, als er findet, dass die Konstanten k um einen gewissen Mittelwert schwanken; „la loi de formation du maltose est donc bien une loi logarithmique".

Die folgende, seiner Arbeit entnommene Tabelle bezieht sich auf einen Versuch mit 3%iger Stärkelösung und Malzamylase; Temperatur 25°.

Minuten	Gebildete Maltose	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^6$	Minuten	Gebildete Maltose	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^6$
29	0,090	0,046	707	184	0,552	0,284	788
53	0,179	0,092	790	227	0,641	0,330	766
89	0,283	0,146	769	326	0,865	0,446	787
113	0,358	0,184	781	402	0,977	0,504	757
150	0,459	0,236	779	467	1,121	0,578	802

Bei Variation der Stärkekonzentration findet Henri (S. 121) folgende Mengen Maltose in Gramm:

Datum 1902	Versuchsdauer in Minuten	Stärkekonzentration			
		3 %	1,5 %	0,75 %	0,375 %
5. 9.	60	0,192	0,174	0,145	—
6. 9.	40	0,180	0,154	0,124	—
11. 9.	40	0,130	0,114	0,112	0,082
20. 9.	30	0,098	0,104	0,100	—

Im Anschluss an diese Versuche wird die Formel

$$k_3 = \frac{a}{t}\left[(m-n)\frac{x}{a} + n \ln \frac{a}{a-x}\right] + \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$$

[1]) V. Henri, Lois générales de l'action des diastases. Thèse, Paris (1903).

vorgeschlagen; die Koeffizienten m und n werden aber nicht bestimmt, und demgemäss ist die Formel nicht geprüft.

Weitere Versuche über das Zeitgesetz der Verzuckerung findet man in den Arbeiten von Pottevin[1]), Effront[2]) und Ling und Davis[3]).

Die nächste eingehende Untersuchung über die Verzuckerung durch Malzamylase stammt von Frl. Philoche[4]). Ihren Bestimmungen nach folgt der zeitliche Verlauf der Verzuckerung von einem gewissen Spaltungsgrad an (etwa 30%) der monomolekularen Formel, vorher nimmt der Reaktionskoeffizient stark ab. Dies zeigt z. B. folgende Versuchsreihe, angestellt mit 2%iger Stärkelösung bei 31,5° (l. c. S 371).

1 g „absol. Diastase" in 50 Liter.

Minuten	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^4$	Minuten	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^4$
25	0,10	30,5	246	0,61	16,6
31	0,16	24,4	270	0,63	16,0
60	0,25	20,8	300	0,66	15,6
90	0,30	17,2	420	0,82	17,7
120	0,36	16,1	485	0,87	17,6
210	0,53	15,6			

Substratkonzentration. Über die aus verschiedenen Stärkekonzentrationen gebildete Menge Maltose gibt folgende Zusammenstellung (S. 277) Aufschluss:

Stärkekonz. in % . .	1	1,5	2	2,5	3
g Maltose in 60 Min. .	0,24	0,30	0,338	0,397	0,397.

Mit der Glykogenkonzentration nehmen die von der gleichen Enzymmenge gebildeten Maltosemengen regelmässig zu (l. c. S. 281).

Enzymkonzentration. Die Verzuckerung wird nicht direkt proportional mit der anwesenden Diastasemenge gefunden. Bedeutet x die zur Zeit t gebildete Maltosemenge, c die Konzentration des Enzyms in g per 100 ccm Lösung, so ist x/c nicht konstant, sondern es gilt eine Beziehung

$$\frac{x}{c} = B - Ac \quad \text{oder} \quad x = Bc - Ac^2.$$

Für Glykogen als Substrat stimmen diese Beziehungen nicht ohne weiteres, wenn auch im wesentlichen eine ähnliche Abhängigkeit von x und c gefunden wurde.

Klempin[5]) schliesst aus einigen Versuchen mit Haferdiastase, dass für dieses Enzym die Schützsche Regel (vgl. Teil I, S. 124) gilt.

---

[1]) Pottevin, Ann. Inst. Pasteur 13, 665; 1899.
[2]) Effront, Les enzymes et leurs applications (Paris 1899).
[3]) Ling und Davis, Jl Inst. Brew. 8, 475; 1902.
[4]) Ch. Philoche, Jl de Chim. Phys. 6, 212 u. 355; 1908.
[5]) Klempin, Biochem. Zs 10, 206; 1908.

Henri van Laer hat eine grosse Reihe von Experimentalbeiträgen zu dem hier besprochenen Thema geliefert[1][2][3]. Er kommt zu dem Ergebnis, dass bis zu einer Stärkekonzentration von 4,5% die Verzuckerung sich der Formel für monomolekulare Reaktionen anschliesst[1d]. Dabei ist eine geeignete Enzymkonzentration vorausgesetzt; wird das Malzenzym durch Verdünnung oder Erhitzung geschwächt, so liefern die einzelnen Verzuckerungsversuche abnehmende Reaktionskoeffizienten erster Ordnung. Henri van Laer schliesst sich, wie auch Marc H. van Laer[4], der Auffassung an, dass die Konzentration der Verbindung Amylase-Stärke, also die Konstante des Gleichgewichtes zwischen Enzym und Substrat die Dynamik der enzymatischen Verzuckerung bestimmt.

Die neueren Versuche von Sherman und Jennie A. Walker sind unter Einhaltung einer bestimmten, nahezu optimalen Azidität (pH = 4,4) ausgeführt und deswegen in höherem Grad anwendbar als ältere Ergebnisse.

Der zeitliche Verlauf wird durch folgenden Auszug aus der Tabelle IV (Jl Amer. Chem. Soc. 39, 1489, 1917) deutlich:

Die Versuche beziehen sich auf 1% Stärke; Puffer KH_2PO_4.

Stunden	0,000025% Enzym		0,00005% Enzym		0,00010% Enzym	
	Maltose in % der Theorie	$k \cdot 10^5$	Maltose in % der Theorie	$k \cdot 10^5$	Maltose in % der Theorie	$k \cdot 10^5$
1	8,7	64	20,8	168	32,9	288
2	16,7	65	31,3	135	52,8	271
4	30,9	66	52,1	133	69,8	216
6	42,3	66	64,2	123	72,9	157
8	52,6	67	72,8	117	73,7	120
30	68,7	27	73,5	32	75,8	34
48	71,3	18	76,0	21	78,9	23
72	71,4	12	76,4	14	79,1	17
96	72,7	9	77,8	11	79,9	12

Sherman und Walker ziehen aus ihren Versuchen u. a. folgende Schlüsse: Wenn in vergleichbaren Versuchen die Enzymkonzentration in gewissen Grenzen variiert wird, so findet man den Grad der Maltosebildung direkt proportional der Enzymkonzentration bis zu etwa dem halben Betrag des theoretisch möglichen Wertes.

Bis zur gleichen Grenze ist unter vergleichbaren Umständen und günstigem pH der Grad der Maltosebildung aus löslicher Stärke proportional der Substratkonzentration.

[1] H. van Laer, Bull. Acad. roy. de Belg. a) nr. 7, 611; 1910. — b) nr. 9—10, 707; 1910. — c) nr. 2, 84; 1911. — d) nr. 8, 305; 1911. — e) nr. 4, 362; 1911. — f) nr. 11, 795; 1911. — g) nr. 4, 395; 1913.

[2] H. van Laer, Bull. Soc. chim. de Belg. 26, 18; 1912.

[3] H. van Laer, Bull. Soc. roy. Sc. med. et nat. de Bruxelles nr. 5; 1913.

[4] Marc H. van Laer, Bull. Soc. chim. de Belg. 29, 214; 1920.

Schliesslich seien noch einige Resultate erwähnt, die Verf. mit Svanberg[1]) gewonnen hat. Bezüglich des zeitlichen Verlaufes erwies sich das erste Stadium der Verzuckerung als eine angenähert monomolekular verlaufende Reaktion, wobei aus 1 g Stärke rund 750 mg Maltose entstehen. In den Figuren 16 und 17 sind die beobachteten Zuckermengen durch ×, die aus den Reaktionskonstanten 0,044 und 0,078 berechneten durch ○ eingetragen.

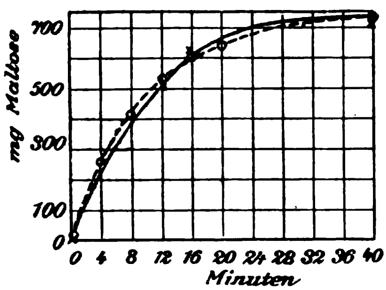


Fig. 16.

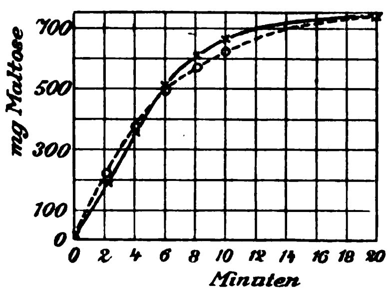


Fig. 17.

Die bei 37° festgestellte Spaltungsgrenze erwies sich bei 52° nur wenig verschoben. Nach Ablauf des ersten Reaktionsstadiums schreitet dann die Maltosebildung, bedeutend verlangsamt, weiter fort.

Die für das erste Stadium berechneten Reaktionskonstanten sind der Enzymkonzentration recht angenähert proportional, wie die folgende Tabelle zeigt; nur bei der Enzymmenge 0,1 ccm wurde eine Abweichung gefunden.

	k	k : Enzymmenge
2 ccm dialysierte Lösung	0,045	0,0225
1 " " "	0,022	0,022
0,5 " " "	0,011	0,022
0,2 " " "	0,0040	0,020
0,1 " " "	0,00164	0,0164

Bei einer Versuchsreihe über den Einfluss der Substratkonzentration waren die Versuchslösungen folgendermassen zusammengesetzt:

a	b	c
25 ccm 4%ige Stärkelösung	25 ccm 2%ige Stärkelösung	25 ccm 1%ige Stärkelösung
10 ccm Phosphatgemisch (p_H 5,6)	10 ccm Phosphatgemisch (p_H 5,6)	10 ccm Phosphatgemisch (p_H 5,6)
1 ccm dialysierte Enzymlösung 1	1 ccm dialysierte Enzymlösung 1	1 ccm dialysierte Enzymlösung 1
36 ccm	36 ccm	36 ccm

[1]) Euler und Svanberg, H. 112, 193; 1920.

Die Resultate werden in folgender Tabelle angegeben:

Relative Stärkemenge	k	k · Substratmenge
4	0,0115	0,023
2	0,022	0,022
1	0,044	0,022

Was die Abweichung des Verzuckerungsverlaufes von der Formel für monomolekulare Reaktionen sowie die Tatsache betrifft, dass die Verzuckerung zunächst nicht vollständig verläuft, so ist mehrfach erwogen worden, ob nicht die Umkehrbarkeit der Reaktion die Ursache ist, bzw. ob nicht die Reaktion bei ihrem natürlichen Gleichgewicht Stärke $\rightleftarrows$ Maltose zum Stillstand kommt. Dies ist bei so verdünnten Stärkelösungen, wie sie hier in Betracht kommen (2—3%), nicht der Fall, wie besonders aus den Versuchen von Wohl und Glimm[1]) hervorgeht.

Der Umstand, dass bei der enzymatischen Verzuckerung die Reaktionskoeffizienten erster Ordnung meist fallend gefunden wurden, hat mehrfach zu der Annahme Veranlassung gegeben, dass der einleitende Teilvorgang, welcher das Ausgangsmaterial spaltet, zur Bildung von Zwischenprodukten (Dextrinen) führt, die einer langsameren Spaltung unterliegen. Eine Prüfung dieser Annahme durch Brown und Glendinning hat zu einem negativen Resultat geführt, insofern keine erheblichen Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit nachgewiesen werden konnten. Auch Henri van Laer (l. c.) hat ähnliche Versuche angestellt.

Ein näherer Einblick in den Mechanismus der Stärkespaltung, welchen sonst kinetische Messungen gestatten könnten, wird dadurch erschwert, dass noch keine für die Zwischenprodukte charakteristische Reaktion bekannt ist, womit ihre Konzentration im Verlauf der Gesamtreaktion festgestellt werden könnte. Einstweilen bietet die Molekulargrösse den einzigen Anhaltspunkt. Biltz[2]) hat versucht, in dieser Weise die Bildung der Zwischenprodukte zu verfolgen; er mass während der enzymatischen Spaltung einer Stärkelösung gleichzeitig die Farbenänderung nach Jodzusatz und die Änderung der Viskosität, welche nach Biltz und Truthe[3]) in direkter Beziehung zum Molekulargewicht stehen soll. Biltz nimmt für die Amylodextrine ein Molekulargewicht von über 10000 an, die für Erythrodextrine 6200—7000 und für die Achroodextrine etwa 3700. Er schliesst aus seinen Versuchen, dass die „Verzuckerungsgeschwindigkeit der Achroodextrine kleiner ist als die der Erythrodextrine, und diese wieder kleiner als die der Amylodextrine". Die Natur der Sache bringt es mit sich, dass diesen Schlüssen erhebliche Unsicherheiten anhaften.

[1]) Wohl und Glimm, Biochem. Zs 27, 349; 1910.
[2]) Biltz, Chem. Ber. 46, 1532; 1913.
[3]) Biltz und Truthe, Chem. Ber. 46, 1377; 1913.

Mit einiger Sicherheit lässt sich einstweilen nur der Verlauf der Gesamtreaktion, d. h. der Maltosebildung, mit dem Verschwinden des durch Jod blau gefärbten Ausgangsmaterials und der nächsten Abbauprodukte vergleichen.

Euler und Svanberg haben untersucht, ob das erste Stadium der Reaktion das Endresultat beeinflussen kann, oder ob die Stärke so schnell verbraucht wird, dass diese einleitende Reaktion — wie bei der Vergärung des Rohrzuckers durch Hefe — auf die Bildungsgeschwindigkeit des Endproduktes ohne erheblichen Einfluss ist.

Minuten	Jodfärbung	mg Maltose
10	blau	118
15	blauviolett	—
18	blauviolett	—
21	rotviolett	210
24	rotgelb	—
27	gelbrot	—
30	gelb	279
60	farblos	286

Die Stärkereaktion (und die Amylodextrinreaktion) verschwinden also erst, nachdem etwa 75% der in der 1. Reaktionsphase entstehenden Maltose gebildet sind.

In diesem Zusammenhang sei auch an die Versuche von Sherman und Schlesinger[1]) erinnert, welche auch für Malz und verschiedene Malzpräparate die „amyloklastische Kraft" und die „verzuckernde Kraft" an löslicher Stärke getrennt ermittelt haben, und zwar die erstere nach der Jodmethode von Wohlgemuth (S. 136), letztere gravimetrisch nach Sherman, Kendall und Clark (S. 138). Den Ergebnissen von Sherman und Schlesinger zufolge kann bei der Untersuchung von Malzamylase das Verschwinden der Jod-Stärke-Farbe in der Reaktionsmischung nicht als Kriterium für die stärkespaltende Fähigkeit des Enzyms dienen; „with malt extracts the quantitative relation between the amyloclastic and saccharogenic figures is possible, though not probable; with precipitated malt amylase the indicated relation is plainly impossible".

Auf das verschiedene Verhältnis der „amyloklastischen" und der verzuckernden Fähigkeit diastatischer Präparate kommen wir bei der Takadiastase (S. 129) zurück.

Verwendet man als Substrat nicht verdünnte Lösungen „löslicher Stärke", sondern Stärkekleister, also Stärke im Gelzustand, so nimmt man unter der Einwirkung diastatischer Enzyme zunächst eine Verflüssigung wahr. Dieser Verflüssigungsvorgang, welcher vermutlich in einer Depolymerisation von Stärkekomplexen, besonders des „Amylopektins", besteht, ist oft nicht scharf genug von der Verzuckerung geschieden worden, wenn auch einzelne

[1]) Sherman und Schlesinger, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1784; 1913.

Versuche nicht gefehlt haben, jeden der beiden enzymatischen Prozesse für sich zur Erscheinung zu bringen. Neuerdings hat Urban Olsson im hiesigen Laboratorium die verflüssigende Wirkung von Malzamylase nach eigener Methode (vgl. S. 135 u. Fig. 19) gemessen und mit der verzuckernden Wirkung (Fig. 18) verglichen.

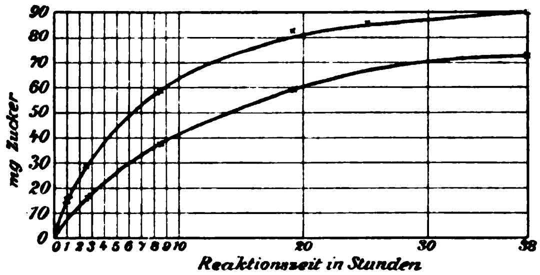


Fig. 18.

Nachdem Frl. Tebb, Brown und Morris, Röhmann, Hamburger und Beijerinck in dem stärkeverzuckernden Enzymgemisch ein Enzym nachgewiesen hatten, welches die Spaltung Stärke in Maltose bewirkt und ein anderes, welches die Maltose weiter zu Glukose abbaut, nehmen Wijsman[1]), Pottevin[2]), Fernbach[3]), Ascoli und Bonfanti[4]) u. a. für die Reaktionen: Stärke-Dextrin und Dextrin-Maltose je ein besonderes Enzym an.

Über die fraktionierte Fällung des stärkelösenden und des verzuckernden Enzyms mit Ammoniumsulfat macht Chrzaszcz Angaben[5]).

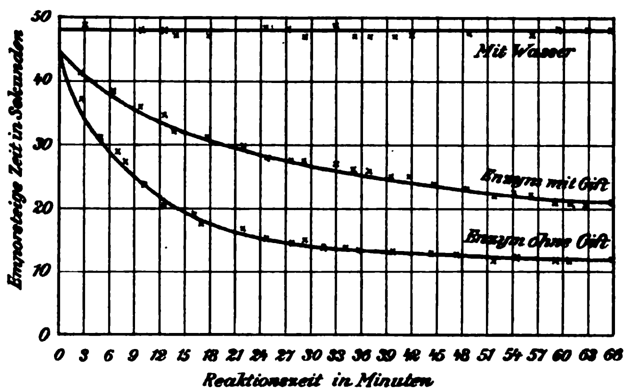


Fig. 19. Vergiftung mit $1{,}7 \cdot 10^{-6}$ n. $CuSO_4$.

Die bemerkenswerte Untersuchung von Sherman und Thomas[6]) zeigt, dass die verzuckernde Wirkung (gemessen durch Reduktion der Lösung) und die stärkespaltende Wirkung (gemessen durch die Jodmethode von Wohl-

[1]) Wijsman, Rec. Trav. Chim. Pays. Bas. 9, 1; 1890.

[2]) Pottevin, Ann. Inst. Pasteur, 13, 665; 1899.

[3]) Fernbach und Schön, C. r. 151, 894; 1910.

[4]) Ascoli und Bonfanti, H. 43, 156; 1904.

[5]) Chrzaszcz, Wochenschr. f. Brau. 28, 510; 1911. — Nach Fränkel und Hamburg (Hofm. Beitr. 8, 389; 1906) soll bei der Dialyse der Amylase nur der verzuckernde Anteil dialysieren. Zum gegenteiligen Ergebnis kam Reinitzer (H. 61, 352; 1909) hinsichtlich der Amylase des Gummis. Daselbst wird auch — allerdings ohne Zahlenangaben — ein Fall erwähnt, in welchem durch Sublimatzusatz die relative Wirkung des verzuckernden und stärkelösenden Enzyms verschoben wurde.

[6]) Sherman und Thomas, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 623; 1915.

gemuth) von äusseren Umständen, wie Azidität usw., ungleich beeinflusst werden. Bei höherer Temperatur (ca. 60°) soll die Verzuckerung gegen die primäre Stärkespaltung (Depolymerisation der Stärke) zurücktreten[1]).

Ein Vergleich der Reaktionszeiten ergibt, dass die Verzuckerung erst einsetzt, wenn die Verflüssigung im wesentlichen beendet ist.

Temperatur.

Über die Temperaturempfindlichkeit der diastatischen Malzenzyme selbst ist bis jetzt nur wenig bekannt. Die Stabilität ist, wie immer, stark von der Azidität abhängig, in zweiter Linie ein wenig vom Puffergehalt der Lösung, vom NaCl-Gehalt wird dagegen die Stabilität der Malzamylase im Gegensatz zu derjenigen des Ptyalins fast gar nicht beeinflusst, wie genaue Versuche von Ernström gezeigt haben. In Gegenwart von Alkaliphosphat liegt das Aziditätsoptimum der Stabilität bei etwa pH = 6, in Gegenwart von Natriumazetat bei 5,5 (Fig. 20), also wesentlich verschoben gegen das Aziditätsoptimum der Verzuckerung.

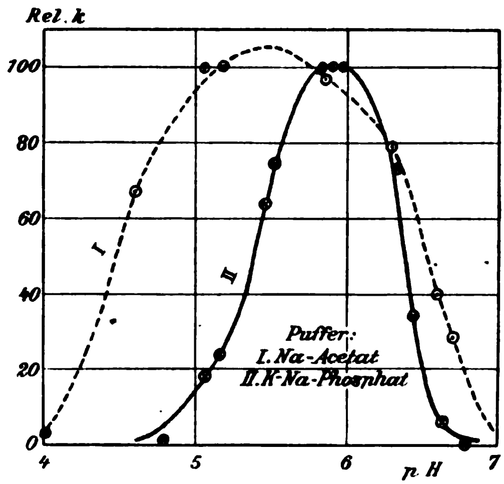


Fig. 20.

Die Untersuchung von Ernström hat für die Stabilitätskonstante k_C (vgl. Teil I, S. 173 u. ff.) folgende Werte ergeben:

45°	$k_C \cdot 10^3 = 0,2$	56,5°	$k_C \cdot 10^3 = 7,5$
50°	1	58°	14
55°	4,8	60°	38.

Definiert man mit dem Verf. (Teil I, S. 189 u. ff.) die Tötungstemperatur als diejenige, bei welcher das Enzym in wässeriger Lösung (ohne Substrat) bei optimalem pH nach 60 Minuten langem Erhitzen auf die Hälfte der Aktivität sinkt[2]), so ergibt sich für Malzamylase 55—56°.

Die Stabilität des verzuckernden Enzyms wird durch Maltose bedeutend erhöht, während nach Wohl[3]) das verflüssigende Enzym besonders durch die Stärke geschützt werden soll. Eine Reihe von Angaben über den Einfluss der Temperatur findet man auch in den bereits zitierten Arbeiten von Henri van Laer, 1910—1912. Nach seinem Befund wird die Amylase durch Erwärmen dahin verändert, dass sie abnehmende Reaktionskoeffizienten erster

[1]) Ältere Versuche über das Verhältnis der Verflüssigungs- und Verzuckerungsgeschwindigkeit findet man in Effronts Arbeiten. Siehe die Monographie dieses Verfassers.

[2]) Nach Klempin (Biochem. Zs 10, 204; 1908) soll das amylolytische Haferenzym (untersucht nach der Jodmethode) erst bei einer Temperatur von 90—95° vollständig wirkungslos werden; die Versuche bedürfen der Nachprüfung.

[3]) Wohl und Glimm, Biochem. Zs 27, 349; 1910.

Ordnung liefert (Bull. 26, 18). Es würde dies darauf hindeuten, dass die Enzymkomponenten verschiedene Stabilität besitzen.

Der Einfluss der Temperatur auf die Geschwindigkeit der Stärkespaltung und Verzuckerung ist schon in zahlreichen Arbeiten untersucht worden, oft aber ohne Einhaltung der massgebenden Bedingungen. Zwischen 20° und 30° ist der Temperaturkoeffizient[1]) $k_{20} : k_{30}$ sehr nahe = 2; die Konstante der im Teil I, S. 172 u. ff. erwähnten Temperaturformel (29) ist demgemäss (abgerundet) A = 12000. Der gleiche Temperaturkoeffizient gilt auch angenähert für Kartoffelamylase (Doby[2]).

Einfluss der Bestrahlung. Eine grundlegende Untersuchung verdankt man Green[3]), welcher besonders die starke Schädigung der ultravioletten Strahlen nachwies.

Bezüglich des Zymogen-Stadiums der stärkespaltenden Enzyme sei hier in historischer Hinsicht auf die Arbeiten von A. Brown und Morris[4]), von Green und von Reychler verwiesen. Ob es sich beim Übergang vom Zymogenzustand in den Enzymzustand innerhalb lebender Organe um etwas anderes als eine Aktivierung durch Elektrolyte u. dergl. handelt, scheint noch nicht bewiesen.

In diesem Zusammenhang mag erwähnt werden, dass die von Biedermann (Fermentforsch. 1—4) behauptete Neubildung von diastatischen Enzymen ausserhalb lebender Zellen nach Wohlgemuths, Sallingers und Teschendorfs negativen Ergebnissen vermutlich auf Bakterienwirkungen zurückgeführt werden müssen.

Enzymbildung. In der oben erwähnten Arbeit von K. Sjöberg ist die Amylasebildung in Samen, besonders an zwei Arten der Gattung Phaseoleae eingehend studiert. Als Beispiel sei die Versuchsreihe mit Phaseolus vulgaris nanus angegeben (bezüglich Sf siehe S. 142).

In der angekeimten Bohne entspricht die Amylasewirkung einem Sf-Wert von 0,0054; 8 Tage nach Beginn der Keimung ist Sf = 0,0253;

nach 14 Tagen Sf = 0,110; nach 17 Tagen 0,350;
„ 16 „ 0,253; „ 32 „ 2,09.

Diese Werte beziehen sich zunächst auf die Bohne selbst, dann, wenn sich die Pflanze entwickelt, für den als Herzblatt noch festsitzenden Teil der ursprünglichen Bohne. Am grössten ist indessen die Enzymwirkung in dem noch unentwickelten Blatt; Maximum am 31. Tag mit Sf = 4,92.

---

[1]) Green (Die Enzyme, S. 31 und 65) nimmt für die Translokations- und die Sekretionsdiastase verschiedene Temperatureinflüsse an.

[2]) Doby, Biochem. Zs 67, 166; 1914.

[3]) Green, Phil. Trans. B. 188, 167; 1897. — Siehe auch Chauchard und Mazoné, C. r. 152, 1709; 1911.

[4]) Brown und Morris, Jl Chem. Soc. 57, 493; 1890.

2. Amylasen in Kryptogamen.

Seit Kossmann 1877 Amylasen in Pilzen nachgewiesen hat, ist das Vorkommen dieser Enzyme in zahlreichen Mikroorganismen bekannt geworden.

Was die Eigenschaften der Kryptogamenamylasen betrifft, so weisen die diastatischen Enzyme der verschiedenen Pilze und Bakterien Unterschiede auf, sowohl hinsichtlich der relativen Menge der verflüssigenden und verzuckernden Enzyme als hinsichtlich der Temperaturstabilität, der optimalen Azidität usw., Unterschiede, welche als das Ergebnis der Anpassung an die äusseren Lebensverhältnisse aufzufassen sind.

Als besondere Anpassungserscheinung an das Nährsubstrat ist hier die Enzymbildung besonders zu erwähnen, über welche bereits eine reiche Literatur existiert. Ich verweise bezüglich dieser biologisch sehr interessanten Vorgänge auf die ausgezeichnete Monographie von H. Pringsheim, Die Variabilität niederer Organismen (Berlin 1910).

Es würde hier zu weit führen, auf alle Einzelbeobachtungen über Kryptogamenamylasen einzugehen und es muss daher ein Hinweis auf einige grundlegende oder umfassende Arbeiten genügen, in welchen man weitere Literaturangaben findet.

	Verfasser	Schriftstelle
Polyporaceen	Zellner	Sitz.-Ber. Akad. Wien IIb.
Aspergillaceen	Duclaux	Chimie biologique 1883.
	Wehmer	Bot. Ztg. 49, 233; 1891. — Lieb. Ann. 269, 383; 1892.
	Effront	C. r. 95, 1324; 1892.
	Bourquelot	Bull. Soc. Mycol. France, 9, 280; 1893 und 10, 235; 1894.
	Laborde	Ann. Inst. Pasteur, 11, 1; 1897.
	Fernbach	Ann. Brass. 2, 409; 1899 und C. r. 131, 1214; 1900.
	Schäffer	Diss. Erlangen 1901.
	Heinze	Zbt. Bakt. II, 12, 180; 1904.

Ältere Ergebnisse, dass die Amylasebildung bei Aspergillus niger durch Stärkezusatz zur Nährlösung gefördert wird, konnten durch neuere Versuche von Euler und Asarnoj[1]) gestützt werden.

Aspergillus Oryzae. Taka-Diastase.

Der in Ostasien sehr verbreitete Pilz Aspergillus Oryzae spielt in Japan zur Bereitung von Saké, Soyasauce (Shoju) und Bohnenbrei (Miso) eine technisch wichtige Rolle.

Im Koji, das zur Herstellung des japanischen alkoholischen Getränkes Saké dient, finden sich Aspergillus Oryzae und einige andere Pilze symbiotisch mit Saccharomyzeten. Kokichi Oshima hat neben Aspergillus Oryzae noch Asp. effusus und Asp. flavus isoliert und charakterisiert.

---

[1]) Euler und Asarnoj, Fermentforsch. 3, 318; 1920. — Über Amylasebildung in Schimmelpilzen siehe auch Boas, Biochem. Zs 78, 308 und 79, 80; 1917 sowie Bot. Ber. 37, 50; 1919.

In neuerer Zeit ist die in diesem Pilz schon 1876 entdeckte Amylase[1]), die sog. Taka-Amylase, von japanischen Forschern, besonders von Takamine und seinen Mitarbeitern und ausserdem im Sherman'schen Laboratorium eingehend studiert worden.

Morphologische Beschreibung des Pilzes: Wehmer, Zbt. Bakt. II, 1, 150; 1895. — Klöcker und Schiönning, Ebenda S. 782. — Saito, Ebenda 17, 20; 1906.

Substrat: Die Verwendung von Stärke als Substrat für die Amylasewirkung haben Sherman und Baker[2]) eingehend besprochen. Sie finden, dass bei Anwendung von Lintner-Stärke, im Autoklaven behandelter Stärke und von α-Amylose (Amylopektin) Maltose in gleicher Menge gebildet wird, während Maquenne's Amylose (β-Amylose) etwas mehr Maltose liefert, relativ weniger Glukose. Maltose ist jedenfalls auch bei der Stärkespaltung durch Aspergillus Oryzae Hauptprodukt, Glukose Nebenprodukt, wie Sherman und Punnet[3]) angeben.

Darstellung. Koji enthält u. a. die Sporen mehrerer Pilze, besonders des Aspergillus Oryzae. Durch Reinkultur auf geeigneten Nährböden kann das Material an diastatischem Enzym angereichert werden. Durch Behandlung mit Wasser kann hieraus ein äusserst wirksamer Extrakt gewonnen werden[4]).

Takadiastase des Handels kann nach Sherman und Tanberg[5]) bis auf das 30fache der ursprünglichen Wirksamkeit angereichert werden durch Extraktion mit Wasser, Ausfällen mit Ammoniumsulfat, Dialysieren und fraktionierte Fällung mit Alkohol. Die gereinigten Produkte zeigen noch folgende Proteinreaktionen: Millon, Xanthoproteinr., Tryptophanr., Biuretr.

Charakteristisch für die diastatischen Präparate aus Aspergillus Oryzae ist das hohe Verhältnis der stärkespaltenden und der verzuckernden Fähigkeit (etwa 8 : 1).

Ein nach besonderem Verfahren (ohne Alkohol) im Takamine-Laboratorium dargestellter Extrakt, Polyzime, ist neuerdings von Takamine jr. und Kokichi Oshima[6]) studiert worden. Die stärkespaltende Fähigkeit, gemessen nach Wohlgemuth, geben diese Forscher zu $D^{40°}_{30\,\mathrm{min}} = 3000$ an, die verzuckernde Fähigkeit beträgt

	21°	50°
Lintner-Einheiten	43	150
Sf.	1,1	3,9.

[1]) Der Pilz sowie die Takadiastase sind sehr reich an kräftig wirksamen Enzymen; siehe z. B. Wohlgemuth, Biochem. Zs 39, 324; 1912.

[2]) Sherman und Baker, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 1885; 1916.

[3]) Sherman und Punnet, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 1877; 1916.

[4]) Siehe J. Takamine, Jl Soc. Chem. Ind. 17, 118; 1898.

[5]) Sherman und Tanberg, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 1638; 1916.

[6]) Takamine jr. und K. Oshima, Jl Amer. Chem. Soc. 42, 1261; 1920.

Die chemische Zusammensetzung ist nach Takamine und Oshima:

Wasser 87,5% Feste Substanzen 12,5% Asche 1,5%.

Der Extrakt hält sich bei gewöhnlicher Temperatur etwa 1/2 Jahr ohne wesentliche Schwächung der diastatischen Fähigkeiten.

Aziditätsbedingungen: Sherman, Thomas und Baldwin geben als Aziditätsoptimum pH = 4,8 an (vgl. S. 100, Fig. 11, Kurve III), und zwar sind die Optima der stärkespaltenden und der verzuckernden Wirkung nach Sherman und Tanberg[1]) wenig voneinander verschieden.

Neutralsalze. Nach Sherman und Tanberg und Saito[2]) üben NaCl und KCl keine bedeutende Aktivierung aus; in dieser Hinsicht verhält sich also Takaamylase wie Malzamylase. Wohlgemuth gibt an, dass die Stärkespaltung zwar nicht durch kleine Salzmengen, aber durch NaCl-Konzentrationen von 0,1 norm. an gefördert werde.

Kinetik. Wesentlich für die Kinetik der Takadiastase ist einerseits der Befund von Sherman und Punnet, dass unter der Einwirkung dieses Präparates neben Maltose auch nicht unbedeutende Mengen Glukose gebildet werden, und andererseits, dass, wie schon erwähnt, die Depolymerisationsfähigkeit sehr hoch ist gegenüber der Verzuckerungsfähigkeit (Sherman und Tanberg). Dieser beiden Umstände wegen ist es natürlich nicht leicht, für die Vorgänge, welche unter der Einwirkung dieser Diastasen eintreten, eine einfache und übersichtliche reaktionskinetische Darstellung zu finden. Es kann deshalb auch von einer ausführlichen Wiedergabe von Zahlen bis auf weiteres abgesehen werden. Nur einige Ergebnisse von Ch. Philoche (l. c. S. 377) über den zeitlichen Verlauf der Stärkespaltung seien angeführt:

Taka-Diastase 1 : 20000. Temp. 31,5°.

1% Stärke			2% Stärke			3% Stärke		
Min.	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^4$	Min.	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^4$	Min.	$\frac{x}{a}$	$k \cdot 10^4$
21	0,06	12,3	19	0,05	11,7	15	0,08	24,1
51	0,11	10,0	39	0,07	7,9	75	0,11	6,7
113	0,15	6,2	55	0,08	6,6	126	0,16	6,0
224	0,26	5,8	208	0,18	4,1	248	0,25	5,0
390	0,36	5,0	275	0,20	3,5	307	0,28	4,6
			453	0,34	3,7	450	0,40	4,1

Temperatur. Die Stabilität der Amylase aus Aspergillus Oryzae scheint nach der Mitteilung von Takamine jr. und Oshima und nach weiteren Messungen des letzteren Forschers von derjenigen der Malzamylase nicht sehr verschieden zu sein. Das Enzym ist stabil unter 37° und wird

[1]) Sherman und Tanberg, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 1638; 1916.

[2]) Saito, Zbt. Bakt. II, 17, 20; 1906.

bei 60° schon durch ½stündiges Erhitzen vernichtet; die Tötungstemperatur dürfte bei etwa 56° liegen. Das stärkeverflüssigende Enzym soll eine hohe Temperaturtoleranz besitzen (über angebliche Regeneration siehe Gramenitzky, H. 69).

Physiologische Wirkung. Nach Einspritzung wurde Hyperglykämie beobachtet.

Enzymbildung. Man verdankt Saito[1]) eine Untersuchung über den Einfluss verschiedener Nährböden auf die Amylasebildung des Aspergillus Oryzae, auf welche hier verwiesen sei.

Technische Anwendungen der Takadiastase.

Die Anwendung der diastatischen Wirkung des Aspergillus Oryzae ist in den ostasiatischen Ländern, besonders in Japan, sehr gross und mannigfach. Das Hauptmaterial ist der bereits genannte Koji; es ist dies eine Pilzvegetation des Aspergillus Oryzae auf dem Gemisch der gekochten Sojabohnen mit gebranntem Weizen.

Soja-Fabrikation. Einer Mitteilung von Saito sei folgendes entnommen[2]): Der Weizen wird in grossen Eisenpfannen gleichmässig gebrannt und zerkleinert, wobei er sich dunkel färbt und einen angenehmen Geruch annimmt. Die Sojabohnen werden zunächst in kaltem Wasser gequellt, dann im Dampfstrom gekocht, und nach Abkühlen im lauwarmen Zustand mit dem vorbehandelten Weizen innig gemischt. Die Mischung wird in flachen Kästchen bei etwa 25—30° der Infektion durch Keime des Asp. Oryzae während 2—3 Tagen ausgesetzt. Der Pilz entwickelt sich nun schnell unter intensiver Atmung und Erwärmung auf etwa 40°. Nach dieser Bereitung des Koji erfolgt das Maischen unter Zusatz von Kochsalz und Wasser. Die darauf folgende Gärung, bei welcher auch die proteolytischen Enzyme des Pilzes stark in Wirksamkeit treten, nimmt im Durchschnitt 1 Jahr in Anspruch. Die Sojasauce (welche der Anwendung und Wirkung nach etwa unserem Fleischextrakt entspricht[3]), enthält rund 30% Trockensubstanz; man findet darin neben etwa 10% Kochsalz Ammoniak, Aminosäuren, Xanthinbasen, freie Säuren, darunter Milchsäure und endlich Alkohol.

Miso (Bohnenbrei) wird ebenfalls aus Koji hergestellt und zwar in ähnlicher Weise wie Soja; die Eiweissspaltung ist aber hier weniger weitgehend.

Der Saké, ein in Japan beliebtes Getränk, welches 12—15% Alkohol enthält, wird aus Reiss bereitet, welcher durch Koji verzuckert wird. Gedämpfter Reis wird unter Zusatz von Wasser mit Koji eingemaischt und der dicke Brei zunächst bei niederer Temperatur (10°) sich selbst überlassen.

---

[1]) Saito, Wochenschr. f. Brau. 27, 181; 1910.

[2]) Siehe auch die Arbeit von Nishimura. Bull. Coll. Agric. Tokyo. 3. 194.

[3]) Siehe Kellner, Chem.-Ztg. 1895, sowie Kellner, Mori und Nagaoka. H. 14.

Die Masse verflüssigt sich und es tritt, während die Temperatur allmählich auf 20—30° steigt, alkoholische Gärung ein. Die dazu erforderliche Hefe stammt teils aus dem angewandten Koji her, teils aus den Keimen in der Luft des Gärungskellers[1]).

Mucoreen.

Die bei den ostasiatischen Völkern seit alten Zeiten ausgenutzte Fähigkeit einzelner Mucoreen, Stärke zu verzuckern, wurde 1887 von Gayon und Dubourg an Mucor racemosus und einigen anderen Arten studiert. Unter den wichtigsten Arbeiten seien erwähnt:

Mucor	Verfasser	Schriftstelle	Bemerkung
Amylomyces Rouxii	Calmette	Ann. Pasteur 6, 605: 1892	Isoliert aus der „tonkinesischen Hefe".
Mucor alternans	Sanguineti	Ann. Pasteur 11, 264; 1897.	
Rhizopus Oryzae und Chlamydomucor Oryzae	Went u. Prinsen Geerligs	Verh. K. Akad. v. Wetensch. Amsterdam II, 4. Nr. 2.	
Rhizopus tonkinensis Rhizopus japonicus	Colette und Boidin	Bull. Assoc. Chim. de sucr. et distill. 16, 862.	
Rhizopus japonicus	Henneberg	Zs Spir. Ind. 25, 205; 1902.	

Über diastatische Wirkungen sonstiger Mucoreen siehe die Tabelle in Lafars Handbuch der technischen Mykologie, Bd. 4, S. 527.

Enzymbildung: In Mucor mucedo ist bis jetzt unter normalen Verhältnissen keine Amylase nachgewiesen worden. Verf.[2]) konnte nach längeren Versuchen, Amylasebildung hervorzurufen, dieses Ziel durch symbiotische Kultur mit einer Hefe erreichen, worauf eine weitere Anreicherung der Amylase durch Züchtung in Stärkelösungen gelang.

Hefen.

Besonders bemerkenswert ist, dass die Hefe das Glykogen ihrer eigenen Zellen spaltet[3]). Das Enzym, oft „Glykogenase" genannt, tritt aber nach aussen hin weder gegen Glykogen noch gegen Stärke in Wirksamkeit, solange die Zellen leben[4]). Im Presssaft wird Glykogen schnell gespalten, wie Cremer[5]) nachgewiesen hat. Auch wenn die Hefezellen autolysiert werden tritt das Enzym in Wirksamkeit; nach Harden und Paine[6]) in hohem Grade unter der Einwirkung plasmolysierender Salzlösungen. Trockenhefe scheint dagegen wenig wirksam zu sein, was auffallen muss, da die Durchlässigkeit der Zellmembran durch das Trocknen bedeutend erhöht wird. Im Kapitel

[1]) Weitere Einzelheiten siehe bei Kozai, Zbt. Bakt. II, 6, 385; 1900. — Über Saccharomyzeten aus Sakéhefe: R Nakazawa ebenda 22. 529; 1909.

[2]) Euler, Zs f. Elektrochem 24, 173; 1918.

[3]) In Saccharomyces apiculates fand Henneberg (Zs Spir. Ind. 25, 378 und 553; 1902) keine Amylase bzw. „Glykogenase".

[4]) A. Koch und Hosaeus, Zbt. Bakt. 16, 145; 1894.

[5]) Cremer, Zs Biol. 31, 183; 1894 und 32, 1; 1895.

[6]) Harden und Paine, Proc. Roy. Soc. Bd. 84, 448; 1912.

über alkoholische Gärung werden wir gelegentlich der Selbstgärung auf diese noch nicht geklärten Verhältnisse zurückkommen.

Dextrine (höhere Amylosen) werden von zahlreichen Hefen vergoren und dieser Vergärung geht nach Brown und Morris eine hydrolytische Spaltung voraus. Die Fähigkeit der Hefen zur Dextrinvergärung würde darnach durch ihren Gehalt an „Dextrinasen“ (also etwa Okto- und Tetraamylasen) bestimmt sein. Lindner[1]) hat zahlreiche Hefen hinsichtlich der Dextrinvergärung untersucht. Für seine 4 Hefetypen, Pombe, Logos, Saaz und Frohberg ist offenbar die Fähigkeit zur Dextrinspaltung charakteristisch; Logos scheint „Achroodextrine“ verhältnismässig gut zu vergären.

Grünalgen.

Über den Amylasegehalt und die Amylasebildung einiger Grünalgen, Ulothrix zonata, Cladophora glomerata, Cladophora fracta und Spirogyra hat K. Sjöberg[2]) eingehende Versuche angestellt.

Das Wirkungsoptimum lag bei pH = 4—5.

Die Bildung des stärkespaltenden Enzyms (untersucht nach Wohlgemuth) wird durch Stärkegehalt der Nährlösung gefördert, durch Zuckergehalt vermindert. Chloroform erhöht die Amylasewirkung von Algenpräparaten. Sehr bemerkenswert ist die Steigerung der Amylasewirkung durch 3stündige Behandlung der Algen mit 96%igem Alkohol.

Das Sonnenlicht hat auf die Bildung von Amylase in den Algen unter den eingehaltenen Versuchsbedingungen keinen Einfluss. Die Algen bilden schon nach einigen Stunden in der Sonne deutlich Stärke, die Enzymwirkung zeigte aber keine Veränderung.

Bakterien.

Das Verhältnis der Fähigkeit zur Verflüssigung, Depolymerisation und Verzuckerung der Stärke ist bei verschiedenen Bakterien verschieden, was auch den bei anderen Mikroorganismen gewonnenen Ergebnissen entspricht. Was die Bakterienarten betrifft, in welchen Amylasen gefunden worden sind, so muss auf die Zusammenstellungen von Fuhrmann[3]), von Kruse[4]) und von Fermi[5]) verwiesen werden.

Die Eigenschaften von diastatischen Bakterien-Enzymen sind bis jetzt sehr wenig untersucht, auch sind diese noch selten isoliert worden. Eine Untersuchung von Avery und Glenn Cullen[6]) an Pneumokokken ergab als Aziditätsoptimum einen pH-Wert von etwa 7.

[1]) Lindner, Woch. f. Brau. 17, 713; 1900.
[2]) K. Sjöberg, Fermentf. 4, 97; 1920.
[3]) Fuhrmann, Die Bakterienenzyme. Jena 1907.
[4]) Kruse, Allgemeine Mikrobiologie. Leipzig 1910.
[5]) Fermi, Zbt. Bakt. II, 12, 1904. — Arch. f. Hyg. 10, 1; 1890.
[6]) Avery und Glenn Cullen, Jl of exp. med 32, 583; 1920.

Besondere Erwähnung verdient der von Schardinger isolierte und untersuchte

Bacillus macerans.

Morphologie[1]: Im Schwärmerstadium stellt der Bazillus schlanke, lebhaft bewegliche Stäbchen dar; Länge 4—6 μ und darüber, Dicke 0,8—1 μ; auf sauren Nährsubstraten werden die Stäbchen länger.

Im Stadium der Sporenbildung und Reifung werden die Stäbchen unbeweglich; nach vollzogener Sporenbildung schwindet das Stäbchen vollständig. Die reifen freien Sporen sind oval $\lambda = 2\ \mu$, $\delta = 1{,}5—1{,}8\ \mu$. Die Sporen sind gegenüber der Temperatur kochenden Wassers sehr widerstandsfähig.

Biologie: Wachstum auf den gebräuchlichen (nicht sauren) Nährböden zwischen 15—40°. Kultur nach Schardinger auf Kartoffelkeilen bei 37—40° oder auf Zwetschgenbrei[2]) oder auf Maisnährböden unter Zusatz von Hefenextrakt[3]). Durch Zusatz von Hefenwasser oder Extrakt von Malzkeimen zur Nährlösung werden besonders kräftige Kulturen erzielt.

Das Aziditätsoptimum des Zellenzuwachses von B. macerans liegt nach Euler und Svanberg (1922) bei pH = 6,5—7,0.

Der Bazillus, welcher zunächst dadurch erhebliches Interesse erweckt hat, dass er die Fähigkeit besitzt, Kohlehydrate unter Bildung von Azeton zu vergären, bildet, wie sein Entdecker 1909 fand[4]), aus Stärke kristallisierte Kohlehydrate, die von Schardinger und später eingehender von Pringsheim studierten Amylosen (vgl. S. 84).

Offenbar enthält dieser Mikroorganismus verhältnismässig wenig niedrigere Amylasen, dagegen viel Poly-Amylasen, und ist daher zum Studium der letzteren besonders geeignet.

Technische Anwendungen.

Diastatische Präparate werden teils für die Nahrungsmittelindustrie, besonders die Bäckereien, teils für die Textilindustrie gebraucht. Als „Malzmehl“ wird gemahlenes Darrmalz bezeichnet; es wird besonders aus Gerstenmalz hergestellt. Die verbreitetsten Handelspräparate sind Diamalt und Diastafor, Präparate der Diamalt-Gesellschaft, München und Taka-Diastase bzw. ein Präparat des Takamine-Laboratoriums in Clifton, N. Y., Polyzime, das ohne Alkohol hergestellt ist. Herstellung von Malzextrakten aus Malzschrot für die Bäckerei nach D. R. P. 148844. Durch Verwendung solcher Backhilfsmittel kann Hefe gespart werden.

Diamalt ist ein sirupartiger Malzextrakt, welcher Dextrine und Maltose enthält und diastatisch stark wirksam ist.

In der Textilindustrie wird Diastafor verwendet sowohl zur Herstellung von Appretur und Schlichtemassen aus Stärke, als zum Entschlichten. Zusätze von Diastafor zu Bleichlösungen nach D. R. P. Kl. 8, 279993; (1914).

---

[1]) Schardinger, Wien. klin. Wochenschr. 17, Nr. 8, 1904. — Zbt. Bakt. II, 14, 772; 1905.
[2]) Schardinger, Zbt. Bakt. II, 19, 161; 1907.
[3]) Farbenfabr. Fr. Bayer u. Co, Elberfeld, D. R. P. 291162.
[4]) Schardinger, Zbt. Bakt. II, 22, 98; 1909.

Taka-Diastase findet in Ostasien zur Herstellung von Nahrungs- und Genussmitteln Verwendung (vgl. S. 130), Polyzime besonders in der amerikanischen Textilindustrie.

C. Methoden zur Messung der Stärkespaltung.

Unter den zahlreichen quantitativen Methoden, welche vorgeschlagen worden sind, um den Verlauf der enzymatischen Stärkespaltung und damit die Wirkung enzymatischen Materials zu ermitteln, können wir zwei Gruppen unterscheiden: Durch die eine werden Konzentrations- und Eigenschaftsänderungen der Stärke verfolgt, durch die andere werden die entstehenden Reaktionsprodukte gemessen.

1. Methoden zur Konzentrations- und Eigenschaftsbestimmung der Stärke.

Bei der Anwendung dieser Methoden muss vor allem beobachtet werden, dass die Stärke kein einheitliches Material darstellt und dass sie in kolloider Form zur Anwendung kommt. Der Zustand der stärkehaltigen Flüssigkeit ist also nicht durch die Konzentration allein definiert, sondern besonders auch durch den Dispersitätsgrad.

Das Substrat kommt in zwei verschiedenen Formen zur Verwendung:

1a) als Stärkekleister zur Bestimmung der Verflüssigung,

1b) als „lösliche Stärke" zur Messung des Abbaues der Stärke.

1a) Verflüssigung der Stärke.

Soll die Verflüssigung der Stärke gemessen werden, um die Wirksamkeit von Amylase- (Diastase-) -Präparaten zu bestimmen, so darf nicht übersehen werden, dass verflüssigende und verzuckernde Wirkung der Diastasen zwar oft miteinander einigermassen parallel gehen, dass aber diese beiden Vorgänge nicht quantitativ miteinander verknüpft sind und dass also die Verflüssigung nicht ohne weiteres als ein Mass für die Verzuckerung angesehen werden darf (vgl. S. 123).

Glinski und Walther[1]) haben die Mettsche Methode auch zur Diastasebestimmung angewandt. Enge, beiderseits offene Glasröhrchen werden mit Stärkekleister gefüllt und nach dessen Erstarren in die enzymhaltige Flüssigkeit gelegt. Nach einer gewissen Zeit misst man die Länge des gelösten Stärkezylinders. Die Geschwindigkeit des Vorganges hängt offenbar stark ab von der Diffusion des Enzyms zur freien Oberfläche des Stärkezylinders, sowie von der Geschwindigkeit, mit welcher sich die Reaktionsprodukte von der Oberfläche entfernen; die Bewegung der Flüssigkeit, bzw. der Röhren in der Flüssigkeit ist deswegen von grösstem Einfluss. Zu wissenschaftlichen Zwecken ist die Methode nicht genau genug und wird überhaupt nur in besonderen Fällen zur Anwendung gelangen.

Das gleiche gilt wohl von der Methode von Ed. Müller (Zbl. inn. Med. 1908), welcher statt der Röhrchen Platten von Stärkekleister benutzt.

Von älteren Verflüssigungsmethoden sind ferner noch diejenigen von Pollak[2]) und von

---

[1]) Siehe Pawlow, Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden 1898.

[2]) Pollak, Wochenschr. f. Brau. 1903, 595 und Zeitschr. f. Nahr.- u. Genussm. 6, 729; 1903.

Chrzaszcz[1]) zu erwähnen. Die Genauigkeit dieser Methoden ist natürlich gering, da es schwer ist, den Zeitpunkt der „vollständigen Verflüssigung" anzugeben.

Die eigentliche Verflüssigung, bzw. der Übergang des Substrates aus dem Gelzustande oder einem sehr hochviskösen Zustand zu einer Lösung von bedeutend geringerer innerer Reibung kann nur nach einer der in der Physik gebräuchlichen Methoden zur Bestimmung der inneren Reibung geschehen.

Während sich für dünnflüssige Lösungen die Methode der Ausflussgeschwindigkeit aus kapillaren Röhren eingebürgert hat und wegen ihrer Einfachheit und Genauigkeit auch durchaus zu empfehlen ist, versagt dieselbe für dickflüssige Lösungen. Es muss dann eine Dämpfungsmethode, wie sie z. B. von Ladenburg[2]) beschrieben worden ist, oder die Methode fallender Körper, die sich auf die Berechnungen von G. G. Stokes gründet, herangezogen werden. Letztere Methode hat neuerdings Urban Olsson für vorliegenden Fall sehr zweckmässig ausgearbeitet (vgl. S. 124).

Eine etwa 2%ige Emulsion von Kartoffelstärke wird durch Kochen verkleistert; die auf die Versuchstemperatur vorgewärmte Flüssigkeit wird mit der erforderlichen Pufferlösung und der Enzymlösung versetzt und zugleich mit einer in der Mischung befindlichen hohlen Glaskugel von 6 mm Durchmesser in das Versuchsrohr eingefüllt, das 35 cm lang ist und einen inneren Durchmesser von 1,7 cm besitzt. Unmittelbar hierauf wird das Rohr durch einen Gummistopfen verschlossen; zur Entfernung aller Luftblasen dient ein in den Stopfen eingesetztes Glasrohr, welches durch Gummischlauch und Quetschhahn verschliessbar ist. Die so vorbereitete Röhre wird in einen Thermostaten gebracht, in welchem sie um eine zur Längsrichtung senkrecht stehende Achse gedreht werden kann. Nach einer Umdrehung der vertikal stehenden Röhre um 180° wird das Aufsteigen der hohlen Glaskugel, welche spezifisch leichter als die Flüssigkeit ist, beobachtet, was durch die Fenster des Thermostaten leicht geschehen kann. Mittels eines Chronographen mit zwei Zeigern wird die Zeit gemessen, welche die Kugel zum Aufsteigen (zwischen zwei Marken) braucht. Indem man durch wiederholte Messungen die Abnahme dieser Aufsteigedauer feststellt, erhält man ein Mass für die fortschreitende Verflüssigung (Abnahme der inneren Reibung).

Eine Änderung der Aufsteigezeit von 3 Minuten entspricht einer Viskositätsänderung von 1,05 auf 1,01.

1b) Methoden zur Verfolgung des Abbaues der Stärke.

Von den chemischen Eigenschaften der Stärke, welche sich zur Messung eignen, kommt in erster Linie ihre Aufnahmefähigkeit für Jod bzw. die Bildung der blauen Jodstärke in Betracht; auf dieses Prinzip sind auch zahl-

---

[1]) **Chrzaszcz und Pierozek**, Zs f. Spir.-Ind. 33, 66; 1910.

[2]) **Ladenburg hat eine sehr gute kritische Darstellung dieser Methoden gegeben. Ann. d. Phys. 22, 287; 1907.**

reiche Messmethoden gegründet worden. Die ersten sind wohl von Roberts[1]) und Detmer angegeben, spätere von Takamine[2]) und von Francis, sowie in neuerer Zeit von Wohlgemuth[3]) und von Johnson.

Wohlgemuths Methode hat besonders zahlreiche medizinische Anwendungen gefunden. Sie hat — wie auch das Verfahren von Johnson — den Vorzug der Einfachheit, wenn auch in Fällen, in welchen es auf die Genauigkeit der Resultate ankommt, eine Verzuckerungsmethode vorzuziehen ist und wenigstens als Kontrolle empfohlen sei.

Man beschickt eine Reihe Reagensgläser mit absteigenden Mengen der zu untersuchenden Enzymlösung, fügt zu jedem Röhrchen 5 ccm einer 1%igen Stärkelösung und stellt sofort jedes Röhrchen in ein Gefäss mit Eiswasser, in dem sich ein Drahtkorb zur Aufnahme der Gläschen befindet. Die Anwendung des Eiswassers hat den Zweck, jede Enzymwirkung zunächst vollständig auszuschliessen. Wenn dann alle Gläschen in dieser Weise vorbereitet sind, wird der Drahtkorb mit sämtlichen Gläschen in ein Wasserbad von 40° übertragen; dadurch wird erreicht, dass die Wirkung des Enzyms in allen Portionen zu genau dem gleichen Zeitpunkt einsetzt. Bei dieser Temperatur bleibt der Drahtkorb 30 bis 60 Minuten, je nachdem man den Versuch ausdehnen will, und wird nach Ablauf der entsprechenden Frist wieder in das Gefäss mit Eiswasser übertragen und kurze Zeit darin belassen; auf diese Weise wird die Enzymwirkung wiederum in sämtlichen Portionen zu genau der gleichen Zeit unterbrochen. Damit ist die eigentliche Ausführung des Versuches beendet.

Um nun die Stärke der Enzymlösung festzustellen, wird folgendermassen verfahren:

Sämtliche Reagensgläschen werden etwa bis fingerbreit vom Rande mit Wasser aufgefüllt, zu jedem Gläschen je ein Tropfen einer 0,10 n. Jodlösung zugesetzt und umgeschüttelt. Dabei beobachtet man verschiedene Färbungen, wie dunkelblau, blauviolett, rotgelb und gelb. Diejenigen Gläschen, die eine gelbe bis rotgelbe Farbe aufweisen, enthalten — wenn wir von einem weiteren Abbau der Stärke zu Maltose resp. Traubenzucker absehen — nur noch Achroodextrin resp. Erythrodextrin, die blauviolett gefärbten enthalten ein Gemisch von Erythrodextrin einerseits und Stärke andererseits, und endlich die dunkelblau gefärbten vorwiegend unveränderte Stärke. Als unterste Grenze der Wirksamkeit (limes) bezeichnet Wohlgemuth dasjenige Gläschen, in dem zum ersten Male die blaue Farbe unverkennbar auftritt, das ist also dasjenige Gläschen, das die violette Farbe zeigt. Danach

---

1) Roberts, Jl Chem. Soc. 40, 1051; 1881. — Siehe auch Vernon, Jl Physiol. 27, 174; 1901.

2) Takamine, Jl Soc. Chem. Ind. 17, 118; 437; 1898.

3) Wohlgemuth, Biochem. Zs 9, 1; 1908. — Siehe auch Grundriss der Fermentmethoden. Berlin 1913.

ist in dem vorhergehenden Gläschen sämtliche Stärke mindestens zum Dextrin abgebaut. Aus ihm berechnet sich die Enzymmenge in der Weise, dass die Anzahl Kubikzentimeter einer 1 %igen Stärkelösung bestimmt wird, die durch 1,0 ccm der Enzymlösung in der für den Versuch angewandten Zeit bis zum Dextrin total abgebaut wird.

Das eben farblos gewordene Gläschen enthalte beispielsweise 0,02 ccm Speichel; es wären dann 0,02 ccm Speichel imstande, innerhalb 30 Minuten 5 ccm 1 %iger Stärkelösung in Dextrin umzuwandeln, mithin 1,0 ccm Speichel = 250 ccm 1 %ige Stärkelösung. Die diastatische Kraft für 1 ccm der Enzymlösung bezeichnet Wohlgemuth mit D und gibt gleichzeitig Versuchszeit und Temperatur an (s. S. 141). Für das hier gewählte Beispiel würde sich also ergeben $D_{30'}^{40^\circ} = 250$. Berechnen wir den diastatischen Wert aus einem Versuch, bei dem das Gläschen Nr. 5 als untere Grenze angenommen wird und bei dem das Gläschen Nr. 4, das 0,0125 ccm Speichel enthält, rot gefärbt sei (vgl. die l. c. gegebene Farbenskala), so haben wir folgende rechnerische Überlegung zu machen:

0,0125 ccm bauen in 30′ 5 ccm 1 %ige Stärkelösung ab
1,0000 ccm „ „ 30′ 400 ccm 1 %ige „ „

Mithin $D_{30'}^{40^\circ} = 400$.

Michaelis und Pechstein[1]), welche die Ptyalinwirkung nach dem Prinzip der Wohlgemuthschen Methode untersuchten, unterbrachen die Reaktion durch Zusatz von 10 ccm einer sehr verdünnten, und zwar 0,001 n. Jodlösung. Sie betonen, dass die Farbenreaktion nur in schwach saurer Lösung angewandt werden darf, da im alkalischen Gebiet eine mehr oder minder schnelle Entfärbung der anfänglichen Jodfärbung eintritt.

Starkenstein[2]) hat darauf aufmerksam gemacht, dass bei der Untersuchung von Organbreien oder überhaupt beim Arbeiten mit Mischungen, welche inhomogen sind und aus welchen Eiweisskörper ausfallen, Fehler entstehen, indem sowohl Stärke als Enzym vom Eiweissniederschlag mitgerissen wird. Er schlägt deshalb vor, die Reagensröhren während der ganzen Dauer der Digestion durch einen Schüttelapparat in Bewegung zu halten.

Andere Jodmethoden. Statt den Zeitpunkt für das Verschwinden der blauen Jodreaktion zu bestimmen, schlagen Evans[3]) und Johnson[4]) vor, den Eintritt des Reaktionsstadiums zu ermitteln, in welchem Jod-Jodkalium überhaupt keine Farbenreaktion mehr hervorruft, also des sog. „achromischen Punktes".

Eine Anzahl Kolben werden mit je 50 ccm 2 %iger Lösung von Kartoffelstärke beschickt. Von der zu untersuchenden, ev. geeignet verdünnten Enzymlösung verwendet man 1, 2, 3, 4, 5 und 6 ccm, ergänzt auf 6 ccm und setzt sie bei 40° zu der Stärkelösung. Nach 10 Minuten

[1]) Michaelis und Pechstein, Biochem. Zs 59, 77; 1914.
[2]) Starkenstein, Biochem. Zs 24, 191; 1910.
[3]) C. L. Evans, Jl of physiol. 44, 219; 1912.
[4]) Johnson, Jl Amer. Chem. Soc. 30, 798; 1908.

entnimmt man jeder der sechs Mischungen 5 Tropfen und versetzt sie mit Jod-Jodkaliumlösung (0,016 g J und 0,032 g JK per Liter), um zu ermitteln, welche Probe farblos bleibt. Durch einen zweiten Versuch werden dann die Konzentrationsgrenzen des Enzyms verengert.

Sherman, Kendall und Clark[1]) haben 1910 eine neuere Modifikation der Jodmethode in Vorschlag gebracht, die sich von den früheren durch Anwendung verdünnterer Stärkelösungen, und eines grösseren Volumens der Reaktionsmischung sowie durch die längere Reaktionsdauer unterscheidet. Zu 250 ccm einer 1%igen Stärkelösung wird das Enzym, gelöst in 20 ccm Wasser, zugesetzt; Temp. 40°; gemessen wird die Zeit bis zum Verschwinden der Jodreaktion. Diese Methode hat bei der Untersuchung der Takadiastase (nicht aber von Pankreatin) befriedigende Resultate geliefert.

Eine von Waksman[2]) bei der Untersuchung der Diastase aus Aspergillus Oryzae angewandte Methode gründet sich ebenfalls auf das Verschwinden der Stärke in der Lösung; es wird nämlich der Zeitpunkt festgestellt, bei welchem die Stärkelösung durchsichtig wird; dazu wurde Neutralrot verwendet, welches von der Stärke adsorbiert wird.

2. Methoden zur Bestimmung der gebildeten Maltose.

Auch hier muss hervorgehoben werden, dass viele Diastasepräparate neben Amylasen noch Maltase enthalten und demgemäss auch Glukose entstehen lassen. Die Menge derselben ist manchmal erheblich, besonders bei Versuchen mit Takadiastase[3]).

Die Bestimmung der Maltose geschieht fast durchweg in bekannter Weise durch Fehlingsche Lösung. Die einzelnen Methoden unterscheiden sich hauptsächlich

a) durch die Bedingungen, unter welchen die Verzuckerung ausgeführt wird,

b) durch die Dosierung des Enzymmaterials.

Was die Reaktionsbedingungen betrifft, so wird man immer beim Aziditäts- und Neutralsalz-Optimum des betreffenden Enzyms arbeiten. Es empfiehlt sich also, folgende Vorschriften hinsichtlich der Versuchslösung einzuhalten:

Tierische Amylasen: pH = 6,5
0,1 g NaCl in je 100 ccm Reaktionsmischung.

Malzamylasen: pH = 5
Kochsalzzusatz unnötig.

Hinsichtlich der zu wählenden Temperatur geht aus dem in den Abschnitten A und B Gesagten hervor, dass die Amylasen bei 37—40° unter optimalen Aziditätsbedingungen noch stabil sind. Die Temperaturen 37—40° sind also zur Prüfung der Amylasepräparate geeignet. Die Temperatur soll auf wenigstens 1/5° genau gemessen, konstant gehalten und angegeben werden.

1) Sherman, Kendall und Clark, Jl Amer. Chem. Soc. 32, 1082; 1910.
2) Waksman, Jl Amer. Chem. Soc. 42, 293; 1920.
3) Siehe hierzu Sherman und Punnet, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 1877; 1916.

Würden die Amylasen als Katalysatoren den einfachen Reaktionsgesetzen folgen, so wären weitere Vorschriften über die Prüfungsbedingungen überflüssig; die Reaktionskoeffizienten $k = 1/t \log a/a-x$ wären dann der angewandten Enzymkonzentration proportional. Dies ist aber nicht der Fall und es muss deshalb die Dosierung des Enzymmaterials bei der Prüfung durch Übereinkommen festgestellt werden.

Man ermittelt gewöhnlich diejenige Menge Enzymmaterial oder Enzymlösung, welche erforderlich ist, um unter gewissen Bedingungen in 1 Stunde eine gewisse Menge Maltose zu erzeugen.

Unter den sehr zahlreichen Vorschriften führe ich hier zunächst diejenige von Sherman, Kendall und Clark (l. c. und zwar 1083) an:

4 Flaschen enthalten solche Volumina von Enzymlösungen als 0,2, 0,5, 0,8 und 1,0 mg Enzympräparat entspricht. Jede Flasche wird mit 100 ccm einer wohl gekochten 2%igen Lösung von Lintner-Stärke versetzt. (Bei Untersuchung tierischer Amylasen Zusatz von 300 mg NaCl per 100 ccm Mischung). Einwirkungsdauer 30 Minuten bei 40°. Hierauf wird die Reaktion durch Zusatz von 50 ccm Fehlingscher Lösung unterbrochen, worauf man die Flasche 15 Minuten im kochenden Wasserbad hält. Die Lösung wird nun rasch filtriert und das Cu_2O nach einer genauen Methode gemessen. Das Gewicht des Cu_2O soll 300 mg nicht übersteigen. Wegen der Reduktion durch die lösliche Stärke selbst ist ein Blindversuch notwendig.

Wie die Autoren richtig hervorhoben, ist die diastatische Wirkung nicht der Enzymmenge proportional. Deswegen geben sie in einer Tabelle (l. c. S. 1084) die Beziehung zwischen dem gefundenen Cu_2O und einer von ihnen aufgestellten Reaktionskonstante an.

Euler und Svanberg[1]) haben in ihrer vorläufigen Mitteilung die Reaktionskoeffizienten der Verzuckerung gemessen und zwar bezogen sich diese auf die 1. Reaktionsphase (vgl. S. 121). Zur Prüfung der Amylasewirkung kann in dieser Weise mit Stärkekonzentrationen von 0,72—2,8% gearbeitet werden und mit Enzymkonzentrationen, welche bei 37° und optimaler Azidität Reaktionskonstanten 0,004 bis 0,08 ergeben.

Die Maltose kann nach einer der bekannten Reduktionsmethoden bestimmt werden. Man findet über die sehr brauchbare Methode von Bertrand und die Methode von Bang am Schlusse dieses Bandes nähere Angaben.

Lintner[2]) hat zur brauereitechnischen Bestimmung der diastatischen Kraft von Malz eine früher viel befolgte Anweisung gegeben, welche später nach Versuchen von Chr. Wirth[3]) modifiziert wurde.

Man bereitet einen Malzauszug durch sechsstündige Extraktion von 25 g Malzschrot mit 500 ccm Wasser bei gewöhnlicher Temperatur. Von dem

[1]) Euler und Svanberg, H. 112, 198; 1920.
[2]) Lintner, Jl prakt. Chem. 34, 386; 1886.
[3]) Chr. Wirth, Zs ges. Brauwesen 31, 421; 1908.

klar filtrierten Extrakt werden bei Grünmalz 2, bei hellem Malz 4 und bei dunklem 8 ccm zu 100 ccm einer 2%igen, neutralen Stärkelösung in einem 150 ccm-Kolben zugegeben und 1/2 Stunde bei 20° stehen gelassen. Dann werden 10 ccm 0,10 norm. NaOH zugesetzt, der Kolben wird mit Wasser auf 150 ccm aufgefüllt; die Maltose wird hierauf durch einen titrimetrischen Vorversuch mit Fehlingscher Lösung und schliesslich nach einer der üblichen Reduktionsmethoden, z. B. nach Soxleth, Allihn, Bertrand oder Bang bestimmt. Die Tabellen von Wein sollen keine zuverlässigen Werte liefern.

Die diastatische Fähigkeit wird ausgedrückt durch die Anzahl g Maltose, welche von 100 g Malz geliefert werden.

Ähnliche analytische Vorschriften sind von Ling und neuerdings von Kokichi Oshima[1]) angegeben worden.

Eine Modifikation der Lintnerschen Methode (Kochen mit Fehlingscher Lösung, Zusatz von JK und H_2SO_4 und Titration mit Thiosulfat) hat auch Flohil vorgeschlagen (Jl Ind. a. Engin. Chem. 12, 690; 1920).

Nach der neuerdings von Windisch und Kolbach[2]) angegebenen Vorschrift werden 25 g feingeschrotetes Darrmalz (90% Mehl) bzw. 25 g feinzerquetschtes Grünmalz mit 500 ccm Wasser eine halbe Stunde bei 50° gemaischt, abgekühlt, auf 525 g aufgewogen und blank filtriert.

100 ccm einer 2%igen Lösung von löslicher Stärke „Kahlbaum" (man benutze stets das gleiche Präparat) werden in einem 200 ccm-Kolben mit 5 ccm geeignet verdünnten Malzauszuges versetzt: Nach Durchschütteln wird das Reaktionskölbchen eine halbe Stunde genau auf 20° gehalten. Dann wird durch 10 ccm 0,1 n · NaOH unterbrochen, mit H_2O auf 200 ccm aufgefüllt. Je 30 ccm werden zur Maltosebestimmung entnommen, welche nach Willstätter[3]) jodometrisch ausgeführt wird.

Glykogen-Methode.

Zur Prüfung diastatischer Präparate oder Flüssigkeiten wird man diese Methode kaum wählen; dagegen kann sie zur Anwendung kommen, wenn es sich besonders um die Verfolgung der Glykogenspaltung handelt.

Man verwendet dann etwa eine 5%ige Glykogenlösung, die man unter Zusatz von Toluol mit der Enzymlösung oder mit dem Organbrei versetzt. Von Zeit zu Zeit bestimmt man in der Mischung die Menge des unveränderten Glykogens nach Pflüger, und zwar entweder polarimetrisch oder durch Titration[4]). Bang[5]) hat eine Modifikation angegeben, in welcher ebenfalls das unveränderte Glykogen isoliert, mit HCl hydrolysiert und schliesslich als Glykose titrimetrisch bestimmt wird.

---

[1]) K. Oshima, Jl Ind. a. Engin. Chem. 12, 991; 1920.

[2]) Windisch und Kolbach, Woch. Brau. 38, 149; 1921.

[3]) Willstätter und Schudel, Chem. Ber. 51, 780; 1918.

[4]) Pflüger, Pflüg. Arch. 129, 374; 1909. — Siehe auch Schöndorf, Junkersdorf und Franke, ebenda 127, 274; 1909.

[5]) Bang, Festschr. f. Hammarsten. Wiesbaden 1906.

D. Definitionen und Einheiten der Enzymwirkungen.

Unter Hinweis auf das S. 123 u. 134 Gesagte wird hier davon ausgegangen, dass an der Reaktion Stärke → Maltose mehrere Enzyme beteiligt sind und es muss betont werden, dass die gegenwärtigen Methoden, nach welchen die einzelnen Reaktionsphasen nicht geschieden werden können, nur eine angenäherte und vorläufige Charakterisierung der Wirksamkeit diastatischer Enzympräparate gestatten.

Entsprechend den drei Gruppen von Messmethoden, welche im vorstehenden Abschnitt behandelt worden sind, lässt sich die Einheit der Wirksamkeit entweder auf die Verflüssigung von Stärkegelen beziehen, oder auf das Verschwinden der Stärke aus der Lösung oder endlich auf die Bildung der Maltose.

Misst man die enzymatische Stärkespaltung nach der Wohlgemuthschen Jodmethode, so wird man auch seinem Vorschlag hinsichtlich der Angabe der Wirkungseinheit folgen. Nach Wohlgemuth soll diejenige Anzahl ccm einer 1%igen Stärkelösung ermittelt werden, welche durch 1 ccm der zu untersuchenden Enzymlösung innerhalb der gewählten Versuchsdauer (30 Minuten oder 24 Stunden) bis zum Dextrin abgebaut werden.

Die diastatische Wirkung für 1 ccm der Enzymlösung bezeichnet Wohlgemuth in Abkürzung des Wortes Diastase mit D und gibt durch Indexe Temperatur und Zeit an, mit denen gearbeitet wurde. Also bedeutet:

$$D_{30'}^{40^\circ} = 250,$$

dass 1 ccm der untersuchten Enzymlösung imstande ist, bei 40° in 30 Minuten 250 ccm 1%ige Stärkelösung abzubauen.

Für den Enzymgehalt wird hierdurch natürlich nur insoweit ein richtiges Mass erzielt, als Enzymmenge und Enzymwirkung proportional sind.

Speichel sowie andere Sekrete und Körperflüssigkeiten lassen sich in gleicher Weise messen wie Enzymlösungen. Von Organen werden Extrakte oder Presssäfte hergestellt. Herstellung und Verdünnung mit physiologischer Kochsalzlösung. Spezialvorschläge für Arbeiten mit Organen findet man in der zitierten Monographie von Wohlgemuth, S. 57 u. ff.

Wie schon erwähnt, wird zu technischen Zwecken vielfach noch die Lintnersche Methode angewandt (vgl. S. 139). Die Wirksamkeit diastatischen Materials wird nach Lintner in der Weise angegeben, dass man angibt, wieviel Enzymlösung resp. Malzextrakt erforderlich ist, um in einer bestimmten Zeit (gewöhnlich ½ Stunde oder 1 Stunde) aus einer 2%igen Stärkelösung so viel Zucker abzuspalten, dass 5 ccm Fehlings-Lösung gerade reduziert werden.

Analog geschieht die Berechnung nach Ling. Hat man z. B. 100 ccm einer 2%igen Stärke mit 1,5 ccm Malzextrakt gemischt und die auf 200 ccm verdünnte Lösung 1 Stunde bei 21° stehen lassen. Werden dann 25 ccm

dieser Lösung benötigt, um 5 ccm Fehlingsche Lösung zu reduzieren, so ist die diastatische Fähigkeit

$$\frac{1000}{25\ 1,5} = 26,7.$$

Eine neue Einheit hat Sherman[1]) eingeführt und angewandt. Er arbeitet immer mit 2 g Stärke und schlägt vor, immer 30 Minuten lang bei 40° zu verzuckern. Sherman, Kendall und Clark geben folgende Tabelle an, aus welcher zunächst die Beziehung zwischen der gebildeten Menge Cu_2O und einer Reaktionskonstanten K entnommen werden kann. Aus den K-Werten der Tabelle ergeben sich die Einheiten der Shermanschen „new scale“ durch Division mit der Enzymmenge. Wir geben die Shermansche Tabelle hier wieder:

Cu_2O mg	K	Cu_2O mg	K	Cu_2O mg	K	Cu_2O mg	K
30	9,1	100	31,2	170	54,1	240	78,2
40	12,2	110	34,4	180	57,5	250	81,8
50	15,3	120	37,6	190	60,9	260	85,4
60	18,4	130	40,9	200	64,3	270	89,0
70	21,6	140	44,2	210	67,8	280	92,6
80	24,8	150	47,5	220	71,3	290	96,3
90	28,0	160	50,8	230	74,8	300	100,0

Zur Umrechnung dienen folgende Zahlen (vorausgesetzt 0,0312 g Enzym):

Cu_2O	Cu	mg Maltose	K	„new scale“
30	26,8	24,2	9,1	—
60	53,5	48,6	18,4	—
100	89,4	82,0	13,2	1000

Schliesslich haben Euler und Svanberg[2]) die Wirkungsfähigkeit ihrer Präparate in einer Weise angegeben, welche sich der früher für Saccharasepräparate benutzten anschliesst.

Bezeichnen wir mit k die monomolekulare Verzuckerungskonstante, mit welcher sich der erste, grösste Teil der Verzuckerung vollzieht, mit „g Maltose“ die Anzahl g Maltose, welche bei der durch k gemessenen Reaktion gewonnen werden kann, und mit „g Präparat“ die Menge Enzympräparat, welche im Gesamtvolum der Reaktionsflüssigkeit gelöst wurde, so erhalten wir folgenden Ausdruck für die Wirkungsfähigkeit eines Diastasepräparates hinsichtlich der Maltosebildung

$$\text{Verzuckerungsfähigkeit pro g Trockengewicht, Sf} = \frac{k \cdot \text{g Maltose}}{\text{g Präparat}}.$$

[1]) Sherman, Kendall und Clark, Jl Amer. Chem. Soc. 32, 1073; 1910.

[2]) Euler und Svanberg, H. 112, 193; 1920.

Die Genauigkeit und Brauchbarkeit dieser Definition des Amylasegehaltes geht hervor aus der Konstanz der in der letzten Spalte der folgenden Tabelle angegebenen Werte Sf, welche aus verschiedenen Versuchen gewonnen worden sind; sämtliche Werte gelten für die Temperatur 37° und für pH-Optimum.

Stärke g	Maltose g	Enzymlösung ccm	Trockengewicht der Enzymlösung g	Mittel k	Sf
0,5	0,375	1	0,00077	0,024	11,7
0,5	0,375	2	0,00154	0,045	10,9
0,5	0,375	1	0,00077	0,022	10,7
0,5	0,375	0,5	0,000385	0,011	10,7
0,5	0,375	0,2	0,000154	0,0040	9,75
1,0	0,75	1	0,00077	0,0115	11,2
0,25	0,1875	1	0,00077	0,044	10,7

Der Mittelwert von Sf beträgt 10,8 für das untersuchte Präparat, der mittlere Fehler in einer Bestimmung ist 0,7, also 6% vom Totalwert.

Der so gewonnene Zahlenwert für Sf ist — solange das Substrat nicht genauer definiert und die Grenze der monomolekularen Verzuckerung nur empirisch festgestellt ist — ein vorläufiger. Er wird sich jedoch bei später gewonnener genauerer Kenntnis über die Amylose und ihre Spaltung ohne Schwierigkeiten umrechnen lassen.

Mit der Konstanten k geht natürlich die Spaltbarkeit der angewandten Stärke in den Wert Sf ein. Diese Spaltbarkeit ist nicht für alle Stärkepräparate gleich (siehe hiezu Euler und Svanberg l. c. S. 221).

Der Bereich, in welchem die Wirkungsfähigkeit eines Amylasepräparates durch den Wert Sf genau ausgedrückt wird, liegt zunächst zwischen den Substratkonzentrationen 0,25 und 1,0 g Stärke pro 36 ccm, also zwischen Stärkekonzentrationen 0,72 und 2,8% und zwischen Enzymkonzentrationen, welche bei 37°, optimaler Azidität und Anwesenheit eines geeigneten Neutralsalzes die Reaktionskonstanten 0,004 bis 0,08 ergeben.

Die Umrechnung der Einheit Sf ergibt sich aus folgender Tabelle:

Minuten	Maltose mg	a — x	k
30	82	1418	0,00080
—	1500	—	—

$$Sf = \frac{0{,}0008 \cdot 1{,}5}{0{,}0000312} = 38{,}5.$$

Demgemäss entsprechen 1000 Einheiten „new scale“ einem Wert Sf = 38,5.

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass Sherman und Schlesinger ein hochaktives Amylasepräparat dargestellt haben, dessen

Wirksamkeit sie zu 1500 Einheiten der „new scale“ angeben. Dieses Präparat hat also, in der hier vorgeschlagenen Einheit ausgedrückt, die Wirkungsfähigkeit Sf = 58.

Die vorstehenden Angaben sind dann noch auf eine einheitliche Temperatur zu reduzieren; die Temperaturkoeffizienten sind für tierische und pflanzliche Enzyme verschieden, man findet sie S. 103 und 126.

Für die Umrechnung der Lintnerschen Skala in Sf geht man davon aus, dass 5 ccm Fehlingsche Lösung 0,3682 g Maltose entsprechen (vgl. Wirth, Dissertation l. c.); man kann dann k aus folgender Überschlagsrechnung ermitteln:

Minuten	x	a — x	k
60	36,82	113,18	0,00205
150	150	—	—

Hieraus berechnet man $Sf = \frac{0,00205 \cdot 0,150}{0,00012} = 2,55.$

1000 Lintner-Einheiten F entsprechen also rund 26 Sf.

Eine Umrechnung der Wohlgemuth-Einheit in Sf hat wenig Wert, da sich diese Einheiten auf 2 verschiedene Reaktionen resp. Enzyme beziehen.

Zeitwert: In manchen Fällen wird es genügen, die Wirksamkeit von diastasehaltigem Material dadurch auszudrücken, dass man die Zeit in Minuten angibt, in welcher 1 g Präparat unter oben erwähnten Normalbedingungen (37°, opt. Azidität und opt. NaCl-Gehalt) 2 g Stärke in 100 ccm zur Hälfte in Maltose spaltet.

Nachtrag zur neuen Literatur: Lüers und Wasmund, Fermentf. 5; 1922.

5. Kapitel.

α-Hexosidasen.

Unter Hexosiden werden im folgenden ätherartige Verbindungen der Hexosen verstanden, und zwar sowohl solche vom Typus der Methylglukoside oder der Phenylglukoside, als auch solche vom Typus der Maltose, also sog. Disaccharide oder Biosen. Zu den Hexosiden sind in erster Linie die Glukoside zu rechnen, ferner auch die Fruktoside und Galaktoside usw.

Nach Emil Fischer bestehen zwei Reihen von Hexosiden, die sog. α-Hexoside und β-Hexoside, charakterisiert einerseits durch die Zugehörigkeit der in ihnen enthaltenen Hexosen zur α- bzw. β-Reihe, andererseits durch ihr Verhalten zu zwei verschiedenen Enzymgruppen, welche demgemäss als α- und β-Hexosidasen zu bezeichnen sind. Die Einteilung in eine α- und β-Gruppe wird hier einstweilen beibehalten, obwohl die tatsächlichen Grundlagen derselben nicht ganz feststehen.

Wir können bis jetzt zwei Gruppen unter den α-Hexosidasen unterscheiden, nämlich

α-Glukosidasen und α-Fruktosidasen

und werden dieser Einteilung folgen.

A. α-Glukosidasen.

E. Fischer[1]) nahm an, „dass ein- und dasselbe Enzym der Hefe, die Maltase, sowohl die Methylglukoside als auch die Melibiose und verschiedene als Dextrine bezeichnete, kompliziertere Kohlehydrate angreifen kann“. Indessen hatte Fischer selbst mit Niebel[2]) gefunden, dass Pferde- und Rinderserum, welche die Maltose leicht spalten, α-Methylglukosid gar nicht angreifen. Was Fischer als Annahme ausgesprochen hatte, wurde später oft als sicher bezeichnet. Rona und Michaelis[3]) haben die Unsicherheit dieser Annahme wieder betont, konnten aber aus ihren eigenen Versuchen einen sicheren Schluss nicht ziehen. Erst neuerdings hat Willstätter in einer eingehenden Untersuchung[4]) wichtige Gründe für die Annahme einer

[1]) E. Fischer, H. 26, 60; 1898.

[2]) E. Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. 5, 73; 1896.

[3]) Rona und Michaelis, Biochem. Zs 57, 70; 1913 und 58, 148; 1913. — Siehe auch H. E. Armstrong und E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. 79, 360; 1907.

[4]) Willstätter und Steibelt, H. 115, 199; 1921.

von Maltase verschiedenen α-Methylglukosidase beigebracht. Dass Maltase und α Methylglukosidase zwei verschiedene Enzyme sind, wird dadurch wahrscheinlich, dass die enzymatischen Wirkungen der Hefe auf die Substrate, ausgedrückt durch die Zeitwerte der Hefe für Maltase und Methylglukosidase, kein konstantes Verhältnis aufweisen[1]). Den Quotienten

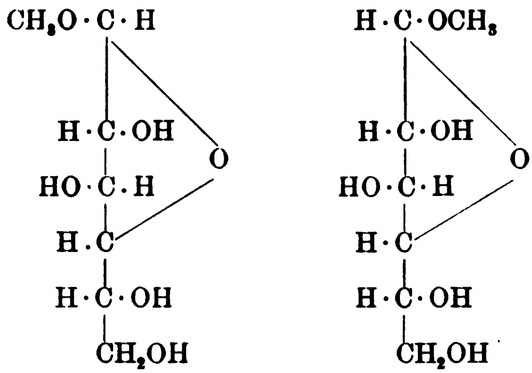
$$\frac{\text{Zeitwert für } \alpha\text{-Glukosidase}}{\text{Zeitwert für Maltase}}$$

finden Willstätter und Steibelt (l. c.) beispielsweise bei verschiedenen Brauereihefen zwischen 7,7 und 0,9 schwankend, noch tiefer fällt er bei Brauereihefe. „Auch bei einer einzigen Hefeprobe ist dieses Verhältnis leicht veränderlich."

„Aus der Verschiedenheit der Maltose und α-Glukosid spaltenden Enzyme ist zu folgern, dass die Hefe für die Hydrolyse zusammengesetzter Zucker eine grössere Zahl besonderer Enzyme ausbildet, als man bisher annahm."

1. α-Methylglukosidase.

Substrat: Den beiden, von E. Fischer 1893 entdeckten Methylglukosiden schreibt man nunmehr ziemlich allgemein die folgenden Formeln zu:



α- und β-Methylglukosid.

Das α-Methylglukosid, Schmelzpunkt 165°, zeigt eine spezifische Drehung $[\alpha]_D = +157^\circ$, während die β-Verbindung links dreht. Beide Isomere werden durch verdünnte Säuren hydrolysiert, und zwar das α-Glukosid etwas langsamer als das β-Glukosid. Zwischen den beiden Formen stellt sich ein Gleichgewichtszustand ein bei 77% des α-Glukosides und 23% des β-Glukosides.

Wie wohl zuerst von Simon[2]) vermutet wurde, entspricht die Isomerie zwischen dem α- und β-Methylglukosid derjenigen zwischen den beiden Tanretschen Glukoseformen:

[1]) Allerdings ist nicht ganz ausgeschlossen, dass Aktivatoren existieren, welche auf das eine oder andere Substrat spezifisch wirken.

[2]) L. J. Simon, C. r. 132, 487 und 596; 1901. — Siehe auch Tanret, Bull. Soc. Chim. (3) 33, 337; 1905.

α-Methylglukosid $[\alpha]_D$	$= + 157^0$	β-Methylglukosid $[\alpha]_D$	$= - 33^0$
α-Glukose	$+ 110^0$	β-Glukose	$+ 19^0$.

Nach E. F. Armstrong[1]) wird bei der raschen enzymatischen Spaltung des α-Glukosides eine Glukose von hoher Anfangsdrehung erhalten, während β-Methylglukosid bei der Einwirkung von Emulsin eine Glukose von niedriger Anfangsdrehung liefert. Dadurch scheint eine experimentelle Stütze für die Annahme beigebracht, dass aus α-Glukosiden α-Glukose, aus β-Glukosiden β-Glukose abgespalten wird. Immerhin bedarf diese offenbar wichtige Beziehung noch einer eingehenden Prüfung.

Vorkommen: Wie S. 149 erwähnt wurde, sind die Verschiedenheiten von Methylglukosidase und Maltase erst 1921 von Willstätter und Steibelt beschrieben worden, und zwar beziehen sich ihre Befunde auf verschiedene Hefen. Wenn demgemäss also auch α Methylglykosidase erst in Hefen nachgewiesen worden ist, so begleitet doch wahrscheinlich das gleiche oder ein ähnliches Enzym die Maltase auch sonst im Pflanzenreich. Ob α-Methylglukosidase im Tierkörper häufig fehlt oder ob die Befunde von Fischer und Niebel Ausnahmen bilden, bleibt noch zu untersuchen.

Das Verhältnis der Maltase- und Glukosidasewirkung variiert bei verschiedenen Hefen recht stark, wie der folgende Auszug aus der Tabelle nach Willstätter und Steibelt (l. c. S. 206) zeigt, welcher die Quotienten der Zeitwerte (vgl. S. 148) angibt.

Hefe	Quotient der Zeitwerte	Hefe	Quotient der Zeitwerte
Löwenbräu	4,5	Weinhefe Assmannshäuser	Anfangswert 2,5 Endwert 3,2
Hofbräu	3,4		
Spatenbräu	Anfangswert 0,9 Endwert 1,1	Brennereihefe M	0,7
		Brennereihefe, Rasse II	1,0
Pschorrbräu	Anfangswert 7,7	Brennereihefe, Rasse XII	Anfangswert 0,8 Endwert 1,3
Frohberg, Unterh. Reink.	Anfangswert 5,5		
Weissbräu Tal	2,5	Brennereihefe, Kopenhagen	Anfangswert 1,8 Endwert 1,1

Darstellung: Über die Isolierung des Enzyms ist bisher nichts bekannt geworden; erwähnenswert ist aber in diesem Zusammenhang das Ergebnis von Willstätter und Steibelt, dass die Glukosidase und die Maltase beim Ausziehen der Hefe nicht in gleichem Masse in Lösung gehen, also nicht mit demselben Quotienten der Zeitwerte in den Hefenextrakten wirken, wie in den Hefen selbst. Die Verschiebung kann auf ungleicher Beständigkeit der Enzyme beruhen, aber auch darauf, dass die Auflösung der kohlehydratspaltenden Enzyme kein einfacher Lösungsvorgang, sondern eine enzymatische Abspaltung ist.

[1]) E. F. Armstrong, Jl Chem. Soc. 83, 1305; 1903.

Einfluss der Azidität: Rona und Michaelis (l. c.) fanden die optimale Zone zwischen pH = 5,8 und 6,6, während für die Wirkung der gleichen Enzymlösungen auf Maltose die Zone 6,0 bis 6,6 angegeben worden war. Als besten Punkt für die Spaltung des Methylglukosides sahen die genannten Autoren pH = 6,2 an, als entsprechender Punkt für die Maltose konnte 6,6 gelten.

Willstätter und Steibelt liessen die Spaltung bei pH = 6,8 verlaufen, da sie weder für Maltase- noch Glukosidasewirkung zwischen 6,0 und 6,8 über die Fehlergrenze hinausgehende Unterschiede beobachten konnten.

Spaltung von Maltose und α-Methylglukosid bei pH = 6,0 bis 7,8.

pH Phosphatpuffer	Maltase		α Glukosidase	
	Maltosespaltung	Zeitwert des Hefeauszuges	Glukosidspaltung	Zeitwert des Hefeauszuges
6,0	43,0	86	32,7	142
6,4	42,8	87	33,3	137
6,8	42,7	87	32,7	142
6,8			28,2	280
7,2	41,4	93	24,5	340
7,8	40,3	99	24,5	340

Auf beginnend alkalischem Gebiet erwies sich die Wirkung also abgeschwächt, aber weniger als in den Versuchen von Rona und Michaelis.

Das Aziditätsoptimum der synthetischen Wirkung scheint nach Versuchen von Bourquelot und Aubry[1]) mit demjenigen der Hydrolyse nahe übereinzustimmen. Dies ist von vornherein nicht notwendig; im Gegenteil könnten für Hydrolyse und Synthese verschiedene Aziditätsbedingungen gelten.

Kinetik. Bei Willstätter und Steibelt findet man eine Versuchsreihe, welche zeigt, dass für einen gewissen Umsatz das Produkt aus Enzymmenge und Zeitdauer konstant gefunden wird. Lösungsvolumen 50 ccm.

Rel. Enzymmenge	Zeit	Prozentische Spaltung
1	800	32,0
2	400	32,0
5	160	31,4
10	80	31,4

Die enzymatische Spaltung des α-Glukosides verläuft zeitlich ähnlich wie diejenige der Maltose, indem in beiden Fällen die Reaktionskonstante 1. Ordnung $k = 1/t \cdot \ln a/a-x$ mit fortschreitender Reaktion stark abnimmt; dies zeigt die Fig. 21.

Zeitwert. Willstätter gibt den Wirkungswert seines Materials in folgender Weise an: Es wird die Zeit in Minuten bestimmt, die 1 g trockene Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung braucht, um bei

[1]) Bourquelot und Aubry, C. r. 161, 184; 1915.

30^{0} 1,347 g α-Methylglukosid (entsprechend 1,25 g abzuspaltender Glukose) zur Hälfte zu hydrolisieren, wenn diese in 50 ccm zusammen mit 60 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ und 45 mg KH_2PO_4 enthalten sind (also bei pH = 6,8).

Die zur halben Spaltung erforderliche Zeit ermittelt Willstätter aus Reaktionskurven wie die folgende: (30°, 2,694 %ige Glukosidlösung).

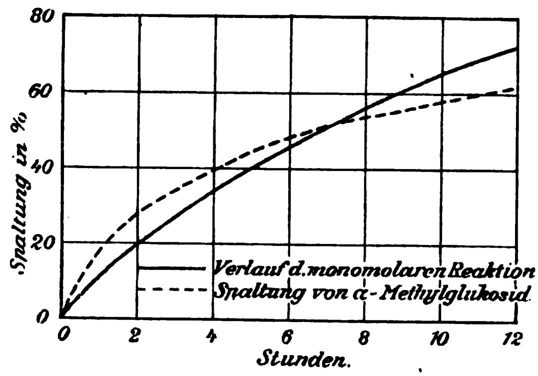


Fig. 21.

Minuten	Drehungsabnahme	Umsatz %
10	0,37	7,6
20	0,60	12,3
40	1,00	20 4
60	1,31	26,7
100	1,76	35,9
160	2,25	45,9
240	2,60	53,1
340	2,95	60,2

„Bei vielen Hefen von normalem Enzymgehalt entspricht der Verlauf der Glukosidspaltung der ermittelten Reaktionskurve. Bei Hefen, die auf α-Methylglukosid schwach wirken, ergibt sich der Zeitwert bei längerer Versuchsdauer günstiger als bei kurzer.“ Diese Erscheinung führt Willstätter auf Enzymzuwachs zurück, auf postmortale Neubildung des Enzyms im Laufe der langen Bestimmungsdauer. In solchen Fällen wird ein Zeitwert für den Bestimmungsanfang extrapoliert und ein zweiter für das Bestimmungsende ermittelt (vgl. z. B. Tabelle S. 147).

Rona und Michaelis haben ihre Messungen dazu benutzt, die Dissoziationskonstante der Verbindung Glukosid—Glukosidase zu berechnen, und zwar in der gleichen Weise wie Michaelis dies früher für die Dissoziationskonstante Rohrzucker—Saccharase getan hat. Man findet diese Berechnung im I. Teil dieses Buches, S. 111 ff. ausführlich referiert. Die Autoren geben folgenden Zahlenwert an:

$$\frac{[\text{Glukosidase — Glukosid}]}{[\text{Glukosidase}] \cdot [\text{Glukusid}]} = 0{,}090.$$

Enzymatische Synthese des α-Methylglukosides.

Im I. Teil dieses Buches ist bereits auf Bourquelots und seiner Mitarbeiter erfolgreiche Arbeiten hingewiesen worden, durch welche die enzymatischen Synthesen überhaupt am Beispiel der Methylglukoside wesentlich geklärt worden sind. Ein Versuch zur Darstellung von α-Methylglukosid ist bereits im I. Teil, S. 220, referiert worden, ebenso Bourquelots Untersuchung über die Lage des Gleichgewichts und dessen Abhängigkeit von der Konzentration der Komponenten.

Besonders bemerkenswert ist, dass eine identische Gleichgewichtslage von beiden Seiten her erreicht worden ist (l. c. S. 334).

	Drehung		Reduz. Zucker
	Anfang	Ende	Ende
Hydrolyse . . .	$+3^\circ 24'$	$+2^\circ 24'$	0,208
Synthese	$+1^\circ\ 4'$	$+2^\circ 22'$	0,216.

Ich kann mich also unter Hinweis auf das früher Gesagte darauf beschränken, hier eine Vorschrift von Aubry[1]) anzuführen, welche sich für die Ausführung der enzymatischen Synthese in grösserem Massstab bewährt hat.

Zu 1800 g reinen Methylalkohols, der sich in einer 10-Literflasche befindet, fügt man 500 g Glukose, gelöst in 4 Liter dest. Wassers. Man schüttelt und setzt die vorher filtrierte Mazeration (3 Liter, enthaltend 10% getrocknete Unterhefe) zu, schüttelt von neuem und ergänzt das Gesamtvolumen auf 10 Liter.

Man lässt die Mischung bei Zimmertemperatur stehen, bis die ursprüngliche Drehung $+5^\circ 18'$ auf etwa $+11^\circ$ gestiegen ist. Die Isolierung und Reinigung des Glukusides geschieht nach den im Teil I, S. 224 erwähnten Angaben.

2. Andere α-Alkyl-Glukosidasen.

Das ebenfalls durch E. Fischer[2]) bekannt gewordene α-Äthylglukosid ist enzymatisch durch Bourquelot synthetisiert worden.

Ausserdem beschreibt Bourquelot mit seinen Mitarbeitern die Synthesen der α-Glukoside folgender einwertiger Alkoholradikale:

Propyl Butyl
Allyl Isobutyl.

Schliesslich wurde die biochemische Synthese von α-Monoglukosiden durchgeführt mit folgenden mehrwertigen Alkoholen[3]):

Glykol, Isopropylglykol, Glyzerin.

---

[1]) Bourquelot, Ann de Chim. (9), 111. 287, und zwar 317; 1915.

[2]) E. Fischer, Chem. Ber. 26. 2400; 1893. — Bezüglich der enzymatischen Spaltung siehe E. Fischer, Chem. Ber. 27, 2985; 1894.

[3]) Siehe Bourquelot, Bridel und Aubry, C. r. 161, 41; 1915 (Glyzerin). — Bourquelot, Ann. Chim. (9) 4, 310; 1915.

3. Glukose-α-Glukosidasen.

Maltase.

Den α-Alkylglukosidasen wird hier die Maltase angereiht. Es sei aber nochmals hervorgehoben, dass die genetischen Beziehungen dieser Diglukase zu den α-Alkylglukosidasen noch nicht feststehen.

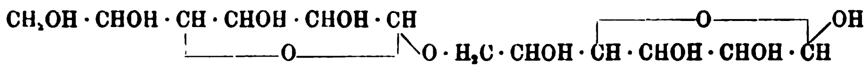
Substrat: Die Maltose kristallisiert mit 1 Mol. H_2O; die Zusammensetzung ist also $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$.

Drehung des Anhydrids: $[\alpha]_D^{20} = + 137{,}2^\circ$; das Drehungsvermögen ist abhängig von der Konzentration und der Temperatur.

Für $p = 5 - 35$ und $t = 15 - 35^\circ$ gilt: $[\alpha]_D = 140{,}375 - 0{,}01837\,p - 0{,}095\,t$.

Drehung des Hydrates: $[\alpha]_D^{20} = 130{,}5^\circ$. Maltose zeigt Mutarotation und zwar steigt die Drehung der frisch hergestellten Lösung, was auf die Herstellung eines Gleichgewichts zwischen einer α-Form $(+ 114^\circ)$ und einer β-Form zurückgeführt wird (Hudson[1])).

Nach den Ergebnissen neuerer Untersuchungen bringt die von Haworth und Leitch[2]) aufgestellte Formel die Eigenschaften der Maltose am besten zum Ausdruck:



Die sterischen Einzelheiten sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Maltose wurde von E. Fischer als Glukose-α-Glukosid aufgefasst, und zwar auf Grund der Zerlegbarkeit durch Hefen, welche das typische, α-d-Glukosid-spaltende Agenz enthalten.

Aus obiger, wie schon aus älteren Formeln erhellt, dass die Maltose eine Fehlingsche Lösung reduzierende Gruppe enthält und überhaupt die Eigenschaften einer Aldose zeigt.

Durch starke Säuren wird Maltose viel langsamer hydrolysiert als Rohrzucker, aber schneller als α-Methylglukosid. Die folgenden relativen Spaltungsgeschwindigkeiten sind nach E. F. Armstrong und Caldwell[3]) berechnet:

Methylglukosid	0,14
Maltose	1,00
Rohrzucker	9,8

Tierische Maltasen.

Vorkommen. Die meisten, wenn nicht alle tierischen Organe und Flüssigkeiten, welche Stärke spalten, enthalten auch Maltase; demgemäss geht der Abbau der Stärke teilweise bis zur Glukose. Der Umstand, dass der

[1]) Hudson, Jl Amer. Chem. Soc. 30, 1781; 1908.

[2]) Haworth und Leitch, Jl Chem. Soc. 115, 809; 1919.

[3]) E. F. Armstrong und Caldwell, Proc. Roy. Soc. B. 73, 526, 1904. — Siehe auch E. F. Armstrong, The simple Carbohydrates and the Glucosides. 3. Aufl. 1919. S. 130.

grösste Teil der Stärke als Maltose gefunden wird, zeigt aber, dass die Wirksamkeit und demgemäss vermutlich die Menge der Maltase in diesem Material im Vergleich zur Amylase gering ist.

Im Speichel und im Pankreassaft findet man nur schwache Maltasewirkung.

Im Darm wurde das Enzym von Bourquelot[1]), Shore und Tebb[2]), Hamburger[3]) und Röhmann[4]) nachgewiesen und näher untersucht. Nach letzterem soll es sich im Jejunum in höherem Grad finden als im Ileum, was mit den Befunden von Euler und Svanberg an Saccharase (siehe dort) in guter Übereinstimmung steht.

Lebermaltasen verschiedener Tiere haben Kusumoto[5]), Tebb und Doxiades[6]) untersucht.

Blutserum besitzt eine ziemlich starke Fähigkeit, Maltose zu spalten, wie aus den Arbeiten von Röhmann[7]), Bial[8]), Hamburger, Tebb und besonders von Fischer und Niebel[9]) hervorgeht.

Wirkungsbedingungen: Über das Aziditätsoptimum tierischer Maltasen ist, von einer Beobachtung von Doxiades abgesehen, nichts bekannt geworden. Man darf wohl annehmen, dass das Optimum nicht weit vom Aziditätspunkt des betreffenden Materials entfernt ist, also in der Nähe von pH = 7 liegt.

Maltase der Phanerogamen.

Im Malz findet man die diastatischen Enzyme meist von kleinen Mengen Maltase begleitet. Auch die übrigen amylasehaltigen Getreidearten dürften Maltase enthalten. Besonders nachgewiesen ist dies hinsichtlich Mais von Beyerinck[10]), welcher aus diesem Material ein Maltasepräparat dargestellt hat, ferner von Geduld[11]) und von Huerre[12]). Letzterer Forscher glaubte im Embryo des Maises zwei Maltasen nachgewiesen zu haben, welche sich durch ihre Löslichkeit und ihre Temperaturempfindlichkeit unterscheiden. Auch im Samen von Fagopyrum (Buchweizen) fand Huerre zwei ent-

---

[1]) Bourquelot, C. r. 97, 1000; 1883.
[2]) Shore und Tebb, Jl of Physiol. 13, (19); 1892. — Tebb, ebenda 15, 421; 1894.
[3]) Hamburger, Pflüg. Arch. 60, 575; 1895.
[4]) Röhmann, Chem. Ber. 27, 3252; 1894. — Röhmann und Nagano, Pflüg. Arch. 95, 533; 1903.
[5]) Kusumoto, Biochem. Zs 14, 217; 1908.
[6]) Doxiades, Biochem. Zs 32, 410; 1911.
[7]) Röhmann, Chem. Ber. 25, 3654; 1892.
[8]) Bial, Pflüg. Arch. 54, 72; 1893.
[9]) Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. 5. 73; 1896.
[10]) Beyerinck, Zbt. Bakt. II, 1, 221; 1895.
[11]) Geduld, Kochs Jahresber. 1891, 220.
[12]) Huerre, C. r. 148, 300; 1908.

sprechende Maltasen. Schon E. Fischer[1]) hatte angenommen, dass die Malzmaltase von der Maltase der Hefen verschieden ist.

Maltase der Kryptogamen.

Hefenmaltase.

Vorkommen. Die meisten Kulturhefen enthalten Maltase, aber sehr verschiedene Mengen. Als maltasefrei werden angegeben:

Saccharomyces Marxianus nach den Befunden von E. Chr. Hansen sowie E. Fischer und Lindner[2]); sowie S. exignus (Hansen).

Saccharomyces apiculatus, Pseudosacch. apiculatus (Klöcker).

Ferner spalten nicht: S. Ludwigii, Willia anomala (Hansen) u. a.

Von Monilia candida wird Maltose nach Fischer[3]) gespalten.

Mit einem Hefenextrakt, welcher Maltose (und Methylglukosid, nicht aber Rohrzucker) angriff, erhielt E. Fischer Spaltung von

Methylfruktosid, nicht aber Methylrhamnosid.

Die vielen Unstimmigkeiten, welche man in der Literatur hinsichtlich des Verhaltens der Hefen zu Maltose und daher auch hinsichtlich ihres Maltasegehaltes findet, sind durch die im folgenden eingehend besprochenen Arbeiten von Willstätter zum grossen Teil aufgeklärt worden.

Willstätter verdankt man auch die ersten quantitativen Maltosebestimmungen in Hefen.

Darstellung: In den älteren Vorschriften (E. Fischer, Lintner und Kröber, sowie Croft Hill) wird übereinstimmend erwähnt, dass es notwendig ist, Hefe zur Extraktion von Maltase zu trocknen.

Nach E. Fischer (H. 26) wird die gewaschene und möglichst scharf abgesogene Hefe auf porösen Tontellern in dünner Schicht ausgebreitet und bei Zimmertemperatur an der Luft getrocknet. Sie wird feinst zerrieben und abermals bei Zimmertemperatur oder bei 30—35° getrocknet. Bei diesem Zustand der Hefe ist die Maltase monatelang haltbar. Soll das Enzym dann zur Anwendung kommen, so wird die getrocknete Hefe mit der 10—15 fachen Menge destillierten Wassers übergossen, bei 30—35° unter zeitweisem Umschütteln 12—20 Stunden ausgelaugt und die Flüssigkeit durch Papier filtriert. Als Antiseptikum empfiehlt sich Toluol. — Röhmann (Chem. Ber. 27) erhitzte seine Hefe vor der Extraktion während einer Stunde auf 105—110°, ein Verfahren, welches sich nach Croft Hill[4]) nicht empfiehlt. Letzterer Forscher trocknet die gewaschene Hefe zwei Tage lang auf poröser Unterlage im Vakuum über Schwefelsäure; sie wird dann gepulvert und durch ein Tuch gesiebt, wodurch man sie als gelblichweisses Pulver erhält. Das Erhitzen der auf feinem Tüll ausgebreiteten Hefe geschieht dann unter viertelstündiger Temperatursteigerung auf 60°, 70°, 90° und 100°. Zur Extraktion wird die Hefe im Mörser mit dem 10 fachen Gewicht einer 0,1%igen Natronlauge verrieben, in Flaschen gefüllt und unter Zugabe von Toluol bei Zimmertemperatur drei Tage stehen gelassen. Hierauf wird der Extrakt filtriert, zuerst durch Papier, dann durch Chamberlandfilter.

---

[1]) E. Fischer, H. 26, 74; 1894. — Chem. Ber. 27, 3479; 1894.
[2]) E. Fischer und Lindner, Chem. Ber. 28, 3034; 1895.
[3]) E. Fischer, Chem. Ber. 27, 3479; 1894.
[4]) Croft Hill, Jl Chem. Soc. 73, 636; 1898.

Dass die Extraktion der Maltase aus Hefen im allgemeinen auf grössere Schwierigkeiten gestossen ist als die Extraktion von Saccharase, beruht nicht nur auf der Schwerlöslichkeit des ersteren Enzyms. Der Unterschied zwischen Saccharase und Maltase beruht nach Willstätter darauf, „dass in der Hefe nach ihrer Abtötung, z. B. durch Chloroform oder Toluol, durch enzymatische Vorgänge Bildung von Säure eintritt, durch welche die Maltase zerstört wird, etwa in dem Masse, wie sie in wässrige Lösung übergeht". Willstätter gelang es, aus frischer Bierhefe starke Maltaselösungen durch Behandlung mit Wasser unter Zusatz von Toluol bei Zimmertemperatur darzustellen, wenn die auftretende Säure durch Ammoniak neutralisiert wurde. Auch getrocknete Hefe gibt nach diesem Verfahren der Neutralextraktion mindestens ebenso wirksame Lösungen als nach den Angaben der Literatur.

„Da bei der Herstellung von Maltaselösungen die beiden Vorgänge: Diffusion des Enzyms aus der Hefezelle und seine Zerstörung durch zugleich entstehende Säure einander entgegenwirken, so ist die Schädigung entweder durch Alkalizusatz in dem Masse der Säureproduktion oder durch ein im Überschuss zugefügtes unlösliches Neutralisationsmittel zu vermeiden." Willstätter, Oppenheimer und Steibelt geben folgende Beschreibung einer Darstellung:

„88 g gewaschene und abgepresste untergärige Münchener Bierhefe wurden unter Zusatz von Toluol mit 132 ccm Wasser (entsprechend 20 g Trockenhefe + 200 ccm Wasser) geschüttelt. Die Flüssigkeit reagierte zunächst neutral, mitunter 50 Minuten lang, manchmal ist schon nach 5—6 Minuten die Reaktion deutlich sauer. Bei den verschiedenen Hefeproben sind erheblich differierende Alkalimengen erforderlich und auch etwas verschiedene Mengen je nach der Weise und Häufigkeit des Neutralisierens. Am besten ist es, häufig neutrale Reaktion auf Lackmus durch vorsichtigen Zusatz von verdünntem Ammoniak herzustellen, was bei einer Extraktionsdauer von 6 Stunden, z. B.

nach	6	20	55	130	180	360	Minuten
	0,6	0,3	12,6	10,5	3,6	4,9	ccm 1%iges Ammoniak,

also im ganzen 32,5, in einem anderen Beispiel 41,8 ccm erforderte. Bei weiterer Extraktion genügt es, alle 2—3 Stunden die immer geringer werdende Säureproduktion unschädlich zu machen. „Bequemer und annähernd ebenso günstig ist es, die Flüssigkeit durch Zusatz von Magnesiumkarbonat oder dergl. konstant bei fast neutraler Reaktion zu erhalten. Dagegen entstehen viel schwächere Ezymlösungen, wenn man die Hefe unter anfänglichem Zusatz bestimmter Mengen von Alkali extrahiert, wie Croft Hill vorschreibt..."

Um Maltase aus getrockneter Hefe zu bereiten, ist das Erhitzungsverfahren von Hill (siehe oben) unnötig.

„20 g Trockenhefe werden mit 200 ccm Wasser und mit Toluol angeschüttelt; die Flüssigkeit reagiert sauer und in diesem Fall wird zur Neutralisation sofort ein bedeutender Teil der überhaupt erforderlichen Alkalimenge verbraucht. Die Maltaselösung wird am besten nach etwa eintägigem Stehen abfiltriert; die Zeitwerte einiger Darstellungen gehen aus dem folgenden Auszug aus Willstätters Tabelle 4 (l. c. S. 240) hervor:

Extraktionsdauer Stunden	1%ig. NH_3 für 20 g Hefe ccm	Drehungsabnahme in 30 Min.	Maltosespaltung % in 30 Min	Zeitwert Min.
1	18,6	1,61°	25,1	140
19	23,2	2,22	34,6	77
15	24,2	2,42	37,8	55
5	—	2,05	32,0	82

Einen weiteren Fortschritt erzielten Willstätter und Steibelt (H. 111 157; 1920) durch die Erkenntnis, dass es sich bei der Gewinnung der Maltase nicht um die Einstellung einer günstigen Wasserstoffkonzentration in der wässrigen Zuckerlösung handelt, dass vielmehr das Störende hier die Erzeugung und die Wirkung von Säure in der Hefezelle selbst ist.

„Das Neutralisationsverfahren zur Gewinnung von Maltase aus Frischhefe wird daher noch verbessert, wenn man durch Verflüssigung der Hefe mittels Chloroform beschleunigte Bildung und Abwanderung der Säure herbeiführt und dann nach Neutralisieren der entstandenen und unter zeitweiligem Neutralisieren der weiter auftretenden Säure die Maltaselösungen fertigstellt." Die sich hieraus ergebende Methode der Maltasebestimmung s. S. 158.

Einfluss der Azidität der Lösung: Michaelis und Rona[1]) fanden für Maltase einer untergärigen Bierhefe das Wirkungsoptimum bei pH = 6,1 — 6,8 und den vermutlich besten Punkt bei 6,6. Über die nahestehende α-Methyl-Glukosidase siehe S. 148.

Überführungsversuche, welche die genannten Forscher anstellten, ergaben, dass die Maltase bei der Azidität der optimalen Wirkung anodisch wanderte. Die neueren Untersuchungen von Willstätter haben indessen gezeigt, dass Wanderungsrichtung im elektrischen Potentialgefälle, Adsorption und überhaupt die Erscheinungen, welche mit der Ionenladung zusammenhängen, stark von Fremdstoffen beeinflusst werden, welche sich in enzymhaltigen Präparaten und Lösungen — sofern diese nicht besonders eingehend gereinigt worden sind — stets in grosser Menge finden.

In vieler Hinsicht interessant, aber noch unerklärt, ist die von Willstätter und Kuhn[2]) beschriebene Elution der Maltase aus ihren Adsorbaten.

Der Einfluss von Neutralsalzen ist nach Michaelis und Rona (l. c., und zwar S. 76) kein irgendwie nennenswerter. Kalziumsalze hemmen indirekt durch Fällung.

[1]) Michaelis und Rona, Biochem. Zs 57, 70; 1913.
[2]) Willstätter und Kuhn, H. 116, 53; 1921.

Kinetik.

Der zeitliche Verlauf der Maltosespaltung erwies sich bei den bis jetzt vorliegenden Untersuchungen so verschieden, dass eine eingehendere Wiedergabe von Versuchsreihen einstweilen wenig Wert haben dürfte; ich beschränke mich deshalb auf einen Hinweis auf die Originalarbeiten von Lintner und Kröber[1]), E. F. Armstrong[2]) und R. O. Herzog[3]). Willstätter, Tr. Oppenheimer und Steibelt[4]) haben aus zwei eigenen Versuchsreihen die Abweichungen vom monomolekularen Verlauf graphisch dargestellt (Fig. 22). Als Ursache dieser Abweichungen können „hemmend

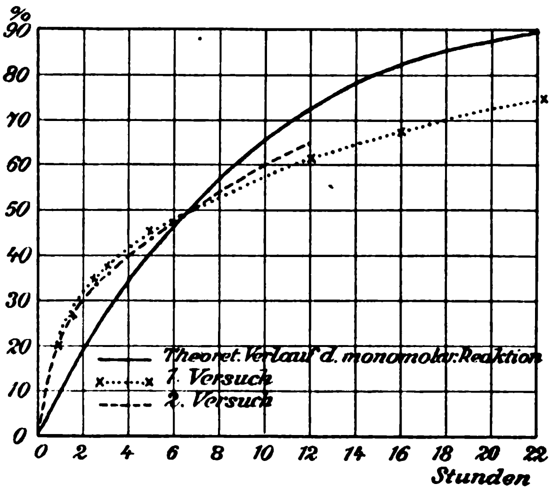


Fig. 22.

wirkende Beimischungen“ angenommen werden (Willstätter); es wäre aber auch möglich, dass eine sterische Form der Maltose mit verhältnismässig hoher Geschwindigkeit hydrolysiert wird, während die durch den Verbrauch veranlasste Nachbildung dieser Form langsamer erfolgt.

Enzymkonzentration und Umsatz finden Willstätter, Oppenheimer und Steibelt in ziemlich weiten Grenzen genau proportional (l. c. S. 235).

Enzymmenge ccm in 50 ccm	Minuten	Drehungs-abnahme °	Maltose-spaltung %	Versuchs-bedingungen
2	150	2,19	34,2	5%ige Maltose-lösung bei 30°
5	60	2,20	34,4	
10	30	2,21	34,5	

Der Einfluss der relativen Mengen Enzym und Substrat wird aus der Untersuchung von E. F. Armstrong (l. c.) ersichtlich. Auch den Einfluss

[1]) Lintner und Kröber, Chem. Ber. 28, 1050; 1895, 70; 1918.
[2]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. 73, 500; 1904.
[3]) R. O. Herzog, Chemisches Geschehen im Organismus. Zs allg. Physiol. 4, 193; 1904
[4]) Willstätter, Tr. Oppenheimer und Steibelt, H. 110, 232; 1921.

der Spaltprodukte und anderer Zuckerarten hat Armstrong experimentell und theoretisch behandelt[1]). Er findet die Maltosespaltung sowohl durch Galaktose verzögert, nicht aber durch Glukose und Fruktose, während nach R. O. Herzog und Kasarnowski diese beiden Hexosen stark hemmen.

Temperatur.

Stabilität des Enzyms. Die Maltase erweist sich sowohl in der Hefe, als auch in Extrakten, als eines der labilsten zuckerspaltenden Enzyme; die Zerstörung macht sich schon bei gewöhnlicher Temperatur bemerkbar, wenn nicht die optimale Azidität eingehalten wird. Dies geht z. B. aus Versuchen von Michaelis und Rona hervor (l. c. S. 79), nach welchen ein Überschreiten des Optimalpunktes sowohl nach der sauren, als nach der alkalischen Seite hin stark schädigt.

Willstätter hat erkannt, dass diese Labilität im sauren Gebiet die bisherigen Darstellungsmethoden wesentlich beeinträchtigt hat.

Enzymbildung: In welchem Grad die Maltase in der Hefe durch Vorbehandlung mit verschiedenen Nährsubstraten angereichert werden kann, steht bis jetzt noch nicht fest. Im hiesigen Laboratorium sind Messungen an einer Hefe angestellt worden, welche von vornherein so gut wie gar keine Maltasewirkung zeigte. Weder Vorbehandlung mit Phosphat, noch mit Lösungen von starkem Peptongehalt oder hoher Maltosekonzentration konnte eine bedeutende Verstärkung der untersuchten Enzymwirkung hervorrufen.

Methoden zur Bestimmung der Wirksamkeit.

Was die analytischen Methoden zur Verfolgung der Maltasewirkung betrifft, so kommt zunächst eine der chemischen Bestimmungen der gebildeten Glukose in Betracht, welche am Schluss dieses Buches behandelt werden.

Einfacher und in vielen Fällen genauer ist die polarimetrische Verfolgung der Maltosespaltung. Willstätter arbeitet mit 10%igen Lösungen von wasserhaltiger Maltose und einem Zusatz von 20% Phosphat-Puffermischung (entsprechend pH = c : a 6,5) bei 30°. Je 25 ccm der Maltoselösung wird mit Enzymlösung und Wasser auf das doppelte Volumen gebracht. Nach Beendigung der Versuche werden 25 ccm der Versuchslösung entnommen und unter Berechnung der Auslaufszeit in 5 ccm $^1/_2$ n.-Sodalösung eingetragen. Anfangsdrehung nach Verdünnung mit der Sodalösung 10,80°; die theoretische Enddrehung würde 4,40° betragen.

Untersuchung der Hefe auf Maltasegehalt. Die Wirkung der frischen Hefe auf Maltose bei Gegenwart abtötender Mittel gibt nach Willstätters Befund noch kein Mass für ihren Maltasegehalt. „Fürs erste sind

[1]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B. 73, 516; 1904.

die Maltasezeitwerte, die sich für die Hefe bei verschiedenen Pufferzusätzen und bei einem bestimmten Pufferzusatz für verschiedene Versuchsdauer ergeben, nicht durchweg konstant. . . . Die enzymatische Wirkung der Hefe ist unter diesen Umständen ferner von dem abtötenden Mittel, z. B. Chloroform oder Toluol in merkwürdigem Masse abhängig. . . ."

Die entscheidende Verbesserung der Methodik, welche Willstätter eingeführt hat, besteht darin, dass man zuerst rasche Verflüssigung der Hefe bewirkt, die Säurebildung und Säureabgabe der Hefe also auf einen kurzen Zeitraum zusammendrängt, und dann erst verdünnt, neutralisiert und den Phosphatpuffer hinzufügt.

„Unter den abtötenden Mitteln ist Toluol wegen seiner zu langsamen Wirkung unanwendbar. Chloroform ist nicht das günstigste, weil das Ergebnis zu stark von seiner Menge abhängt und die optimale Menge sehr niedrig ist, so dass leicht Differenzen vorkommen können. Am geeignetsten ist Essigester. Auch hier ist ein Einfluss der Menge auf die Maltasewirkung deutlich, aber er ist nicht so gross."

Willstätters Methode ist demgemäss folgende (Willstätter und Steibelt, H. 111, S. 168):

11 g Hefe werden im Becherglas mit 1 ccm Essigester versetzt und mit einem Glasstab 4—6 Minuten lang verrieben, bis die Verflüssigung vollständig geworden. Darauf wird die Hefe mit 20 ccm Wasser durchgerührt und alsbald tropfenweise mit $^1/_{10}$ n.-Ammoniak unter stetigem Rühren bis zur neutralen Reaktion versetzt, die man durch Tüpfeln auf hellblaues Lackmuspapier mit Vergleichsproben von destilliertem Wasser feststellt; erforderlich waren 7—9 ccm. Man wartet 10 Minuten und vervollständigt, wenn es nötig ist, die Neutralisation mit etwa 1,5 ccm. Die Hefesuspension wird nun in einen 50 ccm-Messkolben übergeführt, der knapp ausreicht. Zum Versuch entnimmt man nach sorgfältigem Umschütteln 20 ccm, die mit 5,0 g wasserhaltiger Maltose und dem Puffer (120 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ + 90 mg KH_2PO_4) ohne weiteren Zusatz eines antiseptischen Mittels auf 100 ccm gebracht werden. Messungen werden in zwei Intervallen ausgeführt, und zwar so, dass eine der Beobachtungen möglichst in die Nähe von 50% Maltosespaltung führt, z. B. mit 40 und 80 Minuten Versuchszeit.

Definition der Wirksamkeit.

Zeitwert. Nach Willstätter[1]) werden die Hefen und die Maltaselösungen durch die Zeit in Minuten bestimmt, die 1 g getrocknete Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung braucht, um bei 30° 2,5 g Maltose (Hydrat) zur Hälfte zu hydrolysieren, wenn diese mit 30 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2\,H_2O$ und 22,5 mg KH_2PO_4 in 50 ccm enthalten sind.

[1]) Willstätter, Tr. Oppenheimer und Steibelt, H. 110, 233; 1920. — Die Definition des Zeitwertes entspricht der für α-Methylglukoside gegebenen.

Schimmelpilz-Maltase.

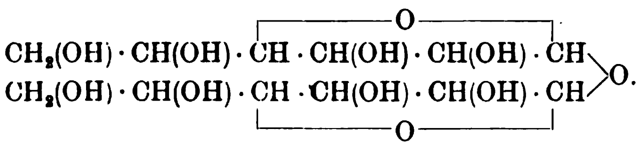
„Takadiastase“ aus Aspergillus Oryzae enthält Maltase, wenn auch in relativ geringer Menge. Die Wirksamkeit dieser Aspergillus-Maltase erstreckt sich nach einigen Messungen von K. Josephson weiter ins saure Gebiet (bis etwa pH = 4), als diejenige der Hefemaltase.

4. Trehalase.

Substrat: Die Trehalose, $C_{12}H_{22}O_{11} + 2\,H_2O$, Schmelzp. 96,5°—97,5°, ist isomer mit Maltose und liefert bei der Spaltung ebenfalls 2 Moleküle Glukose. Die Drehung beträgt nach Hudson $[\alpha]_D^{20} = +197°$. Mutarotation ist bei diesem Zucker nicht beobachtet.

Trehalose reduziert Fehlingsche Lösung nicht, bildet auch kein Osazon; sie enthält also keine Gruppe, welche Aldehydreaktionen gibt.

Die Konstitution kann durch folgende Formel dargestellt werden:

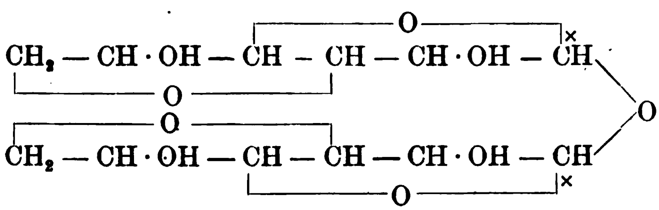


Theoretisch möglich sind drei Diglukosen vom Trehalose-Typus:

α, α
β, β
α, β.

Hudson[1]) nimmt auf Grund der Drehung an, dass die Trehalose die α, α-Form darstellt. Die Isotrehalose liegt vielleicht in dem von E. Fischer und K. Delbrück[2]) aus Aceto-Bromglukose und Silberoxyd gewonnenen amorphen Präparat vor; das dritte isomere ist unbekannt.

Neuerdings hat Karrer[3]) zwei Anhydrozucker vom Trehalosetypus, Diglucan und Isodiglucan, dargestellt, welche er folgendermassen formuliert:



Sie unterscheiden sich durch die Symmetrieverhältnisse an den mit × bezeichneten Kohlenstoffatomen.

Vorkommen: Bourquelot, welcher die Trehalase zuerst benannt und beschrieben hat[4]), fand dieselbe in Schimmelpilzen, und zwar zunächst

[1]) Hudson, Jl Amer Chem. Soc. 38, 1566; 1916.
[2]) E. Fischer und K. Delbrück, Chem. Ber. 42, 2776; 1909.
[3]) Karrer, Widmer und Smirnoff, Helv. 4, 796; 1921.
[4]) Bourquelot, C. r. 116, 826; 1893. — Bull. Soc. Mycol. 9, 49, 189, 230; 1893.

in drei Arten, nämlich Aspergillus niger, Penicillium glaucum und Volvaria speciosa, später in Polyporus sulphureus[1]). Mit Hérissey wies er das gleiche Enzym in zahlreichen Hymenomyzeten nach[2]), besonders in Azaricineen, Boletus-Arten (und zwar teilweise sowohl im Fuss als im Hut), in Russula delica usw.

E. Fischer konnte das Vorkommen eines spezifischen, Trehalose spaltenden Enzyms bestätigen, und zwar nahm er Trehalase auch in Reinhefen vom Frohbergtypus an[3]). Kalanthar[4]) untersuchte verschiedene Hefen auf ihren Trehalasegehalt, ebenso Bau[5]); dieser Forscher fand „über die Gegenwart eines spezifischen, Trehalose spaltenden Enzyms in untergäriger Hefe kein sicheres Resultat" und hält es nicht für angebracht, ein solches für die echten Hefen, soweit sie untersucht sind, anzunehmen. Die unregelmässigen Resultate dürften hauptsächlich in den Mängeln der angewandten Methodik ihren Grund haben.

Vergärung von Trehalose wurde auch noch von Went in Monilia sitophila, von Rommel und Sitnikoff in Amylomyces α und γ, von Lindner[6] in zahlreichen Weinhefen, in Monilia candida und in Mucor Rouxii beobachtet. Nach den von Willstätter an Maltose gewonnenen Ergebnissen ist es nicht unwahrscheinlich, dass auch die Trehalose einer direkten Vergärung ohne vorhergehende Hydrolyse unterliegen kann, so dass die Vergärungsversuche von Bau, Lindner u. a. über die Gegenwart oder Abwesenheit einer Trehalase an sich noch nichts aussagen würden.

Ob Trehalase im Grünmalz gebildet wird, oder ob, wie Bourquelot annimmt, die spaltende Wirkung des Grünmalzes auf der Gegenwart von Schimmelpilzen beruht, steht noch nicht fest.

Im Tierreich fanden sowohl Bourquelot und Gley[7]) (Darmsaft), als besonders Fischer und Niebel[8]) Trehalase; auffallend wirksam gegen Trehalose war das Blut des Karpfens; bei den meisten sonst untersuchten Tieren zeigte das Blutserum spaltende Fähigkeit gegen Maltose, nicht aber gegen Trehalose.

Darstellung: Bourquelot (C. r. 1893) züchtete Aspergillus auf Raulinscher Lösung. Nach eingetretener Sporenbildung hebt man das Myzel ab, wäscht es, zerreibt mit Sand und lässt mit Alkohol 6 Stunden stehen. Man sammelt die Masse auf einem Filter und trocknet im Vakuum. Das

---

[1]) Bourquelot und Hérissey, Bull. Soc. Mycol. 10, 235; 1895.
[2]) Bourquelot und Hérissey, Soc. Biol. 57, 409; 1904. — Bull. Soc. Mycol. 21, 1; 1905.
[3]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1429; 1895.
[4]) Kalanthar, H. 26, 88; 1898.
[5]) Bau, Woch. Brau. 16, 305; 1899 und 32, 141; 1915. Biochem. Zs 73, 340; 1916. — Siehe auch Lafars Handbuch 4, 421; 1906.
[6]) Lindner, Woch. Brau. 17, 713; 1900 und 28, 612; 1919.
[7]) Bourquelot und Gley, Soc. Biol. 47, 515; 1895.
[8]) Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. d. Wiss. 75, 73; 1896.

getrocknete Material wird zur Gewinnung des Enzyms mit Wasser verrieben und stehen gelassen; den filtrierten Extrakt fällt man mit Alkohol. Diese Fällung wird wieder durch Filtration von der Mutterlauge befreit, mit Alkohol gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Dem von der Nährlösung abgehobenen Myzel soll man durch destilliertes Wasser im Verlauf von mehreren Tagen Trehalase entziehen können.

Aziditätsoptimum. Nach Bourquelot in schwach saurer Lösung (0,003% H_2SO_4); auch hierin scheint sich das Enzym von der Maltase zu unterscheiden, die ein annähernd neutrales Medium bevorzugt; genauere Messungen fehlen.

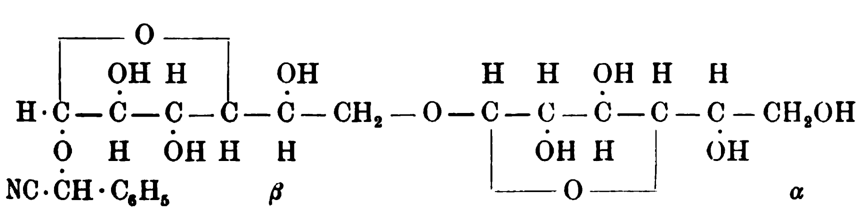
Einfluss der Temperatur. Bei der Untersuchung der wässrigen Enzymlösung fand Bourquelot von 53° an bezüglich Trehalosespaltung eine Schwächung, bei 63° vollständige Zerstörung; dagegen bleibt die Maltasewirkung bis gegen 64° unverändert und verschwindet erst zwischen 74°—75°. Diesen Angaben muss natürlich eine grosse Unsicherheit anhaften, besonders da sich nur eines der beiden Enzyme bei der Azidität des Stabilitätsmaximums befunden haben dürfte. Auch erscheint die Stabilität der Maltase auffallend hoch. Immerhin ist es natürlich wohl möglich, dass die beiden Enzyme sich hinsichtlich ihrer Temperaturbeständigkeit unterscheiden. Trehalase soll nach Bau (1905) beim Trocknen der Hefe recht wenig stabil sein.

5. Amygdalase.

Substrat: Das einfachste Substrat dieses Enzyms ist die Amygdalose, eine Diglukose, welche nach Giaja[1]) aus Amygdalin unter der Einwirkung des Presssaftes von Helix pomatia entstehen soll. Giaja beschreibt diesen Zucker als nicht reduzierend; seine Reinigung und weitere Charakterisierung ist bis jetzt noch nicht gelungen.

Die Amygdalose muss jedenfalls eine Komponente des Amygdalins sein und wird im Amygdalinmolekül von der Amygdalase angegriffen.

Die Konfiguration des Amygdalins ($C_{20}H_{27}NO_{11} + 3\,H_2O$, $[\alpha]^{18}_D = -41^\circ\,16'$ (p = 1,64) Auld) wird von Auld[2]) folgendermassen dargestellt:



Wie schon Fischer festgestellt hatte, enthält das Glukosid selbst keine freie Aldehydgruppe.

---

[1]) Giaja, Soc. Biol. 71, 509; 1911.

[2]) Auld, Jl Chem. Soc. 93, 1276; 1908.

Unter der Einwirkung eines Hefenenzyms, der „Amygdalase“, wird Amygdalin in Glukose und Mandelsäurenitrilglukosid gespalten.

Fischer[1]) hielt die Diglukose des Amygdalins für Maltose „oder eine ganz ähnlich konstruierte Diglukose“. Indessen greift das im „Emulsin“[2]) enthaltene Enzymgemisch Maltose nicht an, während es gegenüber Amygdalin wirksam ist[3]).

Vorkommen: Amygdalase findet sich in „Emulsin“, also im Extrakt süsser oder bitterer Mandeln, vielleicht auch in Salix caprea (Bolin) und in deutschen Bierhefen (Bau), aber nur in sehr geringen Mengen.

Die Verschiedenheit der Amygdalase von Maltase ist besonders durch eine Untersuchung von Caldwell und Courtauld[4]) dargetan worden. Durch Erwärmen eines Auszuges aus Oberhefe auf 45°—50° kann die Wirksamkeit der Lösung gegen Maltose fast vollständig aufgehoben werden, während die Fähigkeit zur Amygdalinspaltung unverändert ist.

Erhitzen auf 55°—60° hebt auch die Amygdalasewirkung auf, während die Rohrzuckerspaltung erhalten bleibt; durch letztere Tatsache wird nach Caldwell und Courtauld die Verschiedenheit der Amygdalase von Saccharase bewiesen.

Hierzu muss allerdings gesagt werden, dass die Aziditäts- und Temperaturempfindlichkeit eines einzigen Enzyms gegenüber verschiedenen Substraten verschieden sein könnte, so dass ein ganz bindender Beweis nicht vorliegt. Ausserdem ist das Verhalten der Amygdalase zu α-Methylglukosid noch nicht aufgeklärt, so dass dieses Enzym mit der α-Methylglukosidase identisch sein könnte.

Aziditätsbedingungen. Bertrand und Compton[5]) hatten angegeben, dass das Optimum im alkalischen Gebiet liegt, die Lage sollte sich mit der Zeit ändern; dagegen findet Willstätter für die kombinierte Amygdalase- und Prunasewirkung pH = 6.

Auch „Emulsin“ aus Presssaft von Helix pomatia spaltet nach Giaja (l. c.) 1 Molekül Glukose aus Amygdalin ab, dürfte also eine Amygdalase enthalten. Diese Enzymwirkung lässt sich nach dem gleichen Autor durch Glukosezusatz zurückdrängen, wodurch die Abspaltung von Amygdalose gelingen soll.

Kinetik. Da das einfache Substrat, Amygdalose noch nicht dargestellt ist, muss die Prüfung an Amygdalin erfolgen. Der Spaltungsverlauf dieses

---

1) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1508; 1895.

2) Als „Emulsin“ bezeichnen wir das Enzympräparat, welches nach Wöhler und Liebig (1837), besser nach Bourquelot und Hérissey, aus dem wässrigen Mandelextrakt durch Fällen mit Alkohol erhalten wird. Das Emulsin enthält mehrere Enzyme und kann also nicht als Bezeichnung für ein besonderes Enzym gebraucht werden. Siehe ferner das Kapitel β-Glukosidasen.

3) Siehe hierzu auch Rosenthaler, Arch. d. Pharm. 245, 684; 1908.

4) Caldwell und Courtauld, Proc. Roy. Soc. Bd. 79, 350; 1907.

5) G. Bertrand und A. Compton, C. r. 159, 434; 1914.

Glukosids in Gegenwart von Emulsin ist, wie zu erwarten, etwas kompliziert, da drei Reaktionen nebeneinander hergehen:

1. die Spaltung des α-Glukosids durch die Amygdalase,
2. die Abspaltung einer β-Glukose aus dem Mandelsäurenitrilglukosid (Prunasin der englischen Literatur) durch eine β-Glukosidase („Prunase“) des Emulsins.
3. die Spaltung des Mandelsäurenitrils in Benzaldehyd und Blausäure.

Wir kommen auf die enzymatische Spaltung des Amygdalins bei der Besprechung der β-Glukosidasen noch zurück und verweisen einstweilen besonders auf die Arbeiten von H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton[1]), sowie Willstättter und Csányi[2]) und Auld (l. c.).

Einfluss der Temperatur: Wie schon oben erwähnt, wird das Hefenenzym, welches Glukose aus Amygdalin abspaltet, bei Erhitzen auf 55°—60° inaktiviert.

B. α-Fruktosidasen.

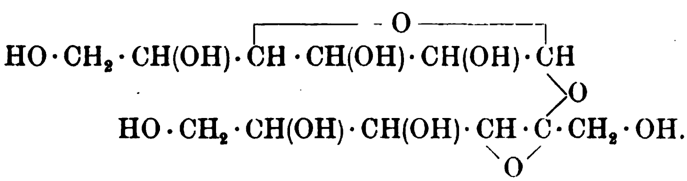
Saccharase (Invertin).

Substrat: Rohrzucker, $C_{12}H_{22}O_{11}$, kristallisiert in grossen monoklinen Kristallen ohne Wasser; zeigt in wässriger Lösung vom Prozentgehalt $p = 4 — 18$ die Drehung

$$[\alpha]_D = 66{,}87 - 0{,}0155\,p,$$

ziemlich unabhängig von der Temperatur.

Die Hydrolyse in die Komponenten Glukose und Fruktose erfolgt durch Säuren bei diesem Zucker schneller als bei der Maltose. Die Fischersche Formel ist durch Haworth und Law[3]) folgendermassen modifiziert worden:



Bei der Hydrolyse würde demnach γ-oxydische Glukose und α-oxydische Fruktose entstehen; dieselben sollen zum Teil in α-oxydische Glukose und γ-oxydische Fruktose umgewandelt werden, und alle vier Stoffe sollen Gleichgewichte zwischen α- und β-Formen bilden. Für die Methodik ist die schon von O'Sullivan und Tompson[4]) berücksichtigte Tatsache wesentlich, dass die optische Drehung des bei der enzymatischen Spaltung auftretenden Hexosegemisches nicht beständig ist, sondern (besonders schnell

[1]) H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. 80, 321; 1906.
[2]) Willstätter und Csányi, H. 117, 172; 1921.
[3]) Haworth und Law, Jl Chem. Soc. 109, 1314; 1916.
[4]) O'Sullivan und Tompson, Jl Chem. Soc. 57, 834; 1890.

durch Zusatz von OH' und H'-Ionen) im positiven Gebiet sinkt, im negativen Gebiet ansteigt.

Verschiedenheit und Einteilung der Saccharasen. Sowohl mit tierischen als mit pflanzlichen Organextrakten und Säften lassen sich starke rohrzuckerspaltende Wirkungen erzielen. Es hat sich in der letzten Zeit ergeben, dass diese Enzyme, je nach der Herkunft, wesentliche Verschiedenheiten aufweisen, die sich — wenigstens gegenwärtig — nicht auf Verschiedenheiten der Lösungskomponenten zurückführen lassen. Es empfiehlt sich deswegen, die tierischen und die pflanzlichen Saccharasen getrennt zu behandeln und letztere in die Saccharasen der Phanerogamen und der Kryptogamen einzuteilen.

1. Tierische Saccharasen.

Vorkommen. Hinsichtlich Organen höherer Tiere ist in erster Linie der Darm zu nennen; jedenfalls kommen andere Organe im Vergleich zum Wirksamkeitsgrad des Darmes kaum in Betracht[1]). Vandevelde[2]) beobachtete Rohrzuckerspaltung durch Pankreasextrakt. Die Angabe von Jona[3]), dass der nach Reiz durch Rohrzucker abgesonderte Speichel Saccharase enthält, schien mir Nachprüfung zu verdienen. Der Effekt war gering. Bemerkenswert ist, dass die rohrzuckerspaltende Wirkung des Blutes höherer Tiere sehr klein ist; wir kommen später hierauf zurück. — Niedrigere Tiere: Wie zu vermuten ist, enthält die Honigblase der Bienen Saccharase[4]); Erlenmeyer[5]) hat das Enzym zuerst im Bienenspeichel gefunden. Aber auch in anderen Insekten ist Saccharase nachgewiesen worden (Axenfeld 1903; Piéron 1907). Der Verdauungstraktus von Schnecken enthält neben vielen anderen Enzymen auch Saccharase.

Darm-Saccharase.

Was die Lokalisation des Enzyms betrifft, so ist die Frage noch unerledigt, ob und in welchem Grade die Saccharase im Darm-Saft (Fistelsaft) vorkommt, ferner in welchen Zellen der Darm-Mucosa die Bildung und ev. Abscheidung des Enzyms erfolgt.

Die ersten, 1877 von Cl. Bernard angestellten Versuche zeigten schon, dass die Rohrzuckerspaltung durch die Darmschleimhaut jedenfalls stärker katalysiert wird als durch den Darmsaft. Bei älteren Versuchen mit Darm-

---

[1]) Die Angaben von Robertson (Edinburgh Med. Jl 39, 2: 1894) über das allgemeine Vorkommen von Saccharasen sind nachzuprüfen.

[2]) Vandevelde, Biochem. Zs 23, 324; 1909.

[3]) Jona, Jl of Physiol. 40, 21; 1910.

[4]) H. Petersen, Pflüg. Arch. 145, 121; 1912. — Saccharase im Honig: v. Fellenberg, Mitt. Leb. u. Hyg. 2, 369; 1912; daselbst Literatur. — Caillas, C. r. 170, 589; 1920.

[5]) Erlenmeyer, Sitz.-Ber. Bay. Akad. 1874, 205.

saft vom Menschen haben allerdings Demant, Vella, Busch und Leube, 1902 auch Nagano, invertierende Wirkung gefunden; quantitative Angaben werden aber nur von Busch gemacht, der sein Resultat an einer mit Darmfistel versehenen Patientin gewonnen hat.

Einen noch schärferen Unterschied fanden Röhmann[1]) sowie Tubby und Manning[2]). Menschlicher, mittels einer Fistel gewonnener Darmsaft invertiert nicht oder in äusserst geringem Grad, wogegen die Darmschleimhaut eine ausgesprochene Wirksamkeit besitzt.

Tierversuche. Von vornherein muss nach E. Fischer[3]) berücksichtigt werden, dass bei der Generalisierung auf diesem Gebiet grosse Vorsicht geboten ist. Es wurden nämlich von verschiedenen Autoren an verschiedenen Tieren ganz voneinander abweichende Resultate gefunden.

Mehrere der in den 80er Jahren mit „Darmsaft" ausgeführten Versuche sind übrigens wegen der ungeeigneten Methodik sowie wegen unzureichender Angabe über die Lage des untersuchten Darmstückes kaum verwertbar.

Mit Darmsaft erhielten Bastianelli sowie Lafayette B. Mendel beim Hund Inversion.

Demgegenüber stehen die genaueren, ebenfalls am Hundedarmsaft mittels Jejunumfistel gewonnenen Resultate von Röhmann und Nagano[4]), bei welchen sich nur eine sehr schwache Inversion ergab, sowie negative Ergebnisse von Lehmann[5]) am Darmsaft der Ziege.

Mit Darmmucosa vom Hund wurde Rohrzuckerspaltung erzielt von Grünert[6]), der sie in frischem Zustand, und von Krüger[7]), der sie nach dem Trocknen als Pulver verwendet hat[8]).

Bierry[9]) verdankt man neuere sorgfältige Versuche, die ebenfalls am Hund angestellt sind, und zwar

1. mit natürlichem Darmsaft, wie er durch eine Dauerfistel ausgeflossen war,
2. mit solchem Darmsaft, nachdem er durch Zentrifugieren geklärt worden war,
3. mit zentrifugierten Darmmazerationen.

Bierrys Ergebnis ging dahin, dass der reine „physiologische" Fistelsaft nicht invertiert. Die Wirksamkeit des trüben unzentrifugierten Saftes

---

[1]) Röhmann, Pflüg. Arch. 41, 424; 1887.

[2]) Tubby und Manning, Guys Hospital Rep. 48, 271; 1892.

[3]) E. Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. d. Wiss. 75, 73; 1896. Diese Autoren haben an verschiedenen Tieren leider nur das Duodenum untersucht.

[4]) Röhmann und Nagano, Pflüg. Arch. 95, 533; 1903.

[5]) Lehmann, Pflüg. Arch. 33, 180; 1884.

[6]) Grünert, Zbl. f. Physiol 5, 285.

[7]) Krüger, Zs f. Biol. 37, 229; 1899.

[8]) S. auch Miura, Zs f. Biol. 32, 266; 1895. — Getrockneten Schweinsdarm haben H. T. Brown und Heron aktiv gefunden, Jejunum und Ileum gleichmässig.

[9]) Bierry, Biochem. Zs 44, 415; 1912. — S. auch Bierry und Frouin, C. r. 142, 1565; 1906.

ist auf die Gegenwart von Darmschleimhautzellen zurückzuführen. Wirksam sind demgemäss auch Mazerationssäfte der Darmschleimhaut.

Man kann der Literatur wohl das Ergebnis entnehmen, dass der Darmsaft, wenn er Rohrzucker spaltet, im allgemeinen im Vergleich zu der Darmschleimhaut wenig wirksam ist, soweit nicht besondere Reizung durch Rohrzucker eintritt[1]).

Es ist dann die Rolle der Lymphozyten zu erwägen. Die enzymatische Wirksamkeit isolierter Lymphozyten ist in letzterer Zeit von Mancini[2]) und von Tschernoruski[3]) studiert worden, aber einen eventuellen Gehalt an Saccharase haben diese Autoren nicht mitgeteilt. Man weiss, dass die Mucosa des Dünndarmes ziemlich reich an Lymphozyten ist; aber zu einer Schätzung ihrer Zahl per Flächeneinheit Darmschleimhaut reichen die vorliegenden Angaben nicht aus. Immerhin dürften die oben erwähnten Versuche nicht wesentlich von den Lymphozyten beeinflusst sein. Siehe auch S. 187.

Nach Ansicht des Verfs.[4]) wird die Rohrzuckerspaltung im Darm durch ein Enzym vermittelt, welches nicht — oder wenigstens nicht direkt — in wässrige Lösung geht, und welches als sog. Endoenzym an der Oberfläche der Mucosa bzw. von Mucosabestandteilen wirkt.

In der histologischen Literatur wird, wenn die enzymatische Wirkung des Darmes behandelt wird, in der Regel nur von den Lieberkühnschen Drüsen gesprochen. Über die Zahl der Lieberkühnschen Drüsen per Oberflächeneinheit Darmwand scheinen in der histologischen Literatur bis jetzt keine genauen Angaben vorzuliegen. Nach mikroskopischen Schnitten lässt sich schätzen, dass auf 1 qcm Darmwand rund 100 Lieberkühnsche Drüsen kommen, wobei die Zotten berücksichtigt sind. Wegen der Kergringschen Falten ist aber die Oberfläche der Mucosa grösser, als die an der äusseren Darmwand vorgenommene Ausmessung ergeben hat, und zwar etwa um 150%, so dass auf den qcm rund 250 Lieberkühnsche Drüsen kommen würden.

Sieht man von dem Sekret dieser Drüsen ab, so wäre mit ihrer wirksamen Oberfläche zu rechnen. Als Dimensionen findet man in der Regel angegeben 0,4—0,3 mm Länge und einen Durchmesser an der Öffnung von im Mittel 60 μ. Die Oberfläche einer Lieberkühnschen Drüse kann im Mittel auf 0,1 qmm geschätzt werden. Indessen kann keineswegs die Gesamtoberfläche der Lieberkühnschen Drüsen als aktive Oberfläche für unsere enzymatische Wirkung in Betracht kommen.

Rechnet man nur den oberen Rand der Lieberkühnschen Drüsen als wirksame Kontaktfläche, so erhält man abgerundet für jede Drüse 0,003 qmm Oberfläche, also per qcm Darm 0,75 qmm, oder bei einer Mucosaoberfläche des Jejunums von 1500 qcm rund 10 qcm wirksame Drüsenoberfläche.

Zum Vergleich kann angegeben werden, dass 1 g der eingehend untersuchten Unterhefe H eine Oberfläche von 26000 qcm besitzt.

Euler und Svanberg (l. c.) haben die Verteilung der Saccharase in den verschiedenen Teilen des menschlichen Darmes untersucht und stellen ihre Resultate in folgender Tabelle zusammen, in welcher k die Inversionskonstanten (gemessen bei 32°) bezeichnen:

---

[1]) Siehe hierzu auch E. v. Knaffl-Lenz, H. 119, 60; 1922.

[2]) Mancini, Biochem. Zs 26, 140; 1910.

[3]) Tschernoruski, H. 75, 216; 1911.

[4]) Vgl. Euler und Svanberg, H. 115, 43; 1921.

Darmteil	Länge	Fläche	k	$\frac{k}{qcm} \cdot 10^5$
Duodenum, Pylorusteil	9 cm	81 qcm	0,011	18,5
Duodenum, Pankreasteil	8 "	80 "	0,015	19
Jejunum, 1,5 m distal vom Duodenum	12 "	48 "	0,024	50
Jejunum, 1—30 cm vom Duodenum	6 "	42 "	0,037	88
Ileum, Abschnitt vor Eintritt ins Caecum	6 "	42 "	0,0015	4

Es geht aus den obigen Zahlen auch hervor, dass der Saccharasegehalt des menschlichen Ileums pro qcm Darmwand nur etwa 5% desjenigen des Jejunums beträgt.

Zum Vergleich sei angegeben, dass der Wert $10^5 \cdot k/qcm$ für den mittleren Teil eines Schweinsdarms zu 5 gefunden wurde.

Berechnet man den gleichen Wert für Unterhefe H, so ergibt sich für $k \cdot 10^5$ pro qcm der Wert 2,4.

A z i d i t ä t s b e d i n g u n g e n. Nach den eingehenden Messungen von Sörensen, Michaelis u. a. liegt das Aziditätsoptimum der Hefensaccharase bei pH = 4,5. Da andererseits die $H^{\cdot}$-Konzentration des Darmsaftes von Auerbach und Pick zu $h = 0{,}5 \cdot 10^{-8}$ angegeben wird, so war es von allgemeinem Interesse, die Wirksamkeit der Darmsaccharase bei diesem Säuregrad zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass in dieser Hinsicht zwischen dem rohrzuckerspaltenden Enzym des Darms und dem der Hefe beträchtliche Unterschiede bestehen.

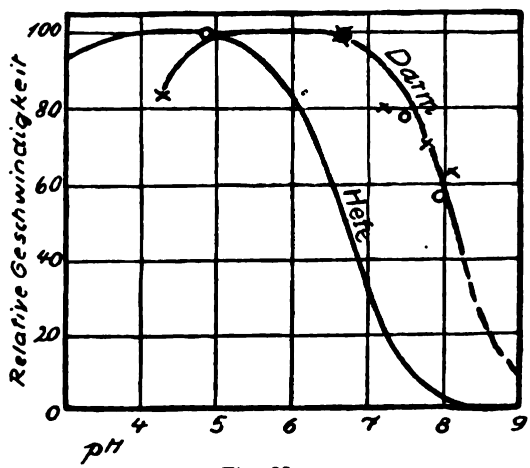


Fig. 28.

Dieselben gehen am deutlichsten aus vorstehender Figur hervor, welche zeigt, dass die Saccharase des Menschendarms ihr Aziditätsoptimum bei pH = 5 — 7 besitzt, also bei einer $H^{\cdot}$-Konzentration, welche etwa 50 mal kleiner ist, als die für Hefensaccharase normale.

Die mit Darm e x t r a k t erhaltenen Inversionskonstanten sind die folgenden:

Anfängl. p_H	Schliessl. p_H	k	Relative Geschwindigkeit
4,5	5,25	0,00372	100
6,6	6,84	0,00372	100
7,5	7,48	0,00291	78
8,0	7,95	0,00218	57

Kinetik. Euler und Svanberg (l. c.) haben ihre Versuche teils direkt mit fein zerschnittenem normalem Darm angestellt, teils mit Darmextrakt. Im ersteren Fall waren die absoluten Geschwindigkeiten grösser, die Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung, $k = 1/t \ln a/a-x$, gaben eine genügende Konstanz, wie folgendes Beispiel zeigt (l. c. Beilage 13):

Stunden	Drehung	k
0	2,40	
20	0,29	0,023
29	0,09	0,022
168	—	

Bei Anwendung von Darmextrakt fielen die k-Werte kleiner aus und nahmen im allgemeinen im Verlauf eines etwa 1 Tag dauernden Versuchs ab, vermutlich infolge der Labilität des Enzyms; siehe auch Euler und Myrbäck[1]).

Einfluss der Temperatur. Da sich hinsichtlich der optimalen Azidität deutliche Unterschiede zwischen Darm- und Hefesaccharase ergeben hatten, wurde von Euler und Myrbäck[1]) auch die Temperaturstabilität der Darmsaccharase näher studiert. Wurde der Darmextrakt 1 Stunde auf verschiedene Temperaturen (bei optimaler Azidität) erhitzt, so ergab sich:

Erhitzungstemperatur	18°	45°	50°	52°	55°
Inversionskonstante $k \cdot 10^4$	23	23	15	7	0.

Berechnet man hieraus den Inaktivierungskoeffizienten $k_C \cdot 10^4$ nach der

Formel (32) $$k_C = \frac{1}{t} \log \frac{k_a}{k_t},$$

(siehe Teil I, S 175), so erhält man:

Erhitzungstemperatur .	18°	45°	50°	52°	55°
Inaktivierungskoeffizient $k_C \cdot 10^4$	0	0	31	86	∞.

Mit einer Lösung von Hefensaccharase von ähnlicher absoluter Wirksamkeit erhält man:

Erhitzungstemperatur	18°	50°	55°	58°	60,5°
Inaktivierungskoeffizient $k_C \cdot 10^4$	0	0	19	45	161.

Die Temperatur der halben Inaktivierung bei 1stündiger Erhitzung ergibt sich aus den erwähnten Messungen für

Darm-Saccharase	51°
Hefe-Saccharase	58,3°.

Man findet also einen Temperaturunterschied in der Stabilität der beiden Enzyme von über 7°.

Natürlich bleibt immer die Möglichkeit, dass die eigentlich wirksamen Teile der beiden Saccharasen identisch sind und dass die Verschiedenheiten nur auf dem Einfluss von Fremdstoffen beruhen, welche in irgendeiner Weise mit dem Enzym verbunden sind.

---

[1]) Euler und Myrbäck, H. 115, 68; 1921.

2. Saccharasen der Phanerogamen.

Vorkommen. Die ausserordentlich grosse Verbreitung der Saccharase im Pflanzenreich geht aus einer Arbeit von Kastle und Clark[1]) hervor. Dieselben fanden Saccharase nicht nur in solchen Pflanzenteilen, welche Rohrzucker als Reservestoff enthalten, sondern weit allgemeiner, überall da, wo Stärke oder Inulin aufgespeichert wird.

Man findet Saccharasen in grünen Blättern (z. B. von Tropaeolum[2]), Tabak[3]), Kartoffel[4]) Polyscias nodosa), Früchten[5]), besonders in Körnern der Gramineen[6]), in Pollen[7]), in Stengeln, Knollen (Kartoffel), seltener in Wurzeln und Rüben.

Besonderes Interesse verdient die Verteilung der Saccharase in der Zuckerrübe, welche zuerst von Robertson, Irvine und Dobson[8]), dann von Ruhland[9]) und von H. Collin[10]) studiert worden ist. In der Rübe von Beta vulgaris wird unter normalen Verhältnissen keine Saccharase angetroffen, und zwar weder im 1. noch im 2. Jahr; sehr saccharasereich sind dagegen die Beta-Blätter; der Enzymgehalt des Stammes nimmt vom Blatt bis zur Wurzel ab.

Darstellung. In der Regel lässt sich ein saccharasehaltiger Saft durch Auspressen des frischen Materials gewinnen; derselbe enthält aber oft oxydierende Enzyme und Polyphenole und lässt sich deswegen nicht immer direkt zu Versuchen benutzen. Es empfiehlt sich also, die Saccharase durch Alkohol oder Azeton aus dem Presssaft auszufällen, oder aber das Pflanzenmaterial zu trocknen und dann mit Wasser oder einer verdünnten Phosphatlösung zu extrahieren.

Die von Vinson (l. c.) studierte Dattelsaccharase soll erst bei der Reife löslich werden, während die unreifen Früchte das Enzym an einen unlöslichen Stoff gebunden enthalten.

Kinetik. Einige Versuche mit Saccharase aus Kartoffelknollen teilt Doby (l. c.) mit.

---

[1]) Kastle und Clark, Amer. Chem. Jl 30, 422; 1903.

[2]) Brown und Morris, Trans. Chem. Soc. 63, 604; 1893.

[3]) Oosthuizen und Shedd, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1289; 1913. — Mosca, Gazz. chim. ital. II, 431; 1913.

[4]) Doby, Biochem. Zs 71, 495; 1916.

[5]) Besonders genau untersucht ist das Enzym der Dattel, und zwar von Vinson, Jl Amer. Chem. Soc. 30, 1005; 1908.

[6]) J. O'Sullivan, Jl Chem. Soc. 77, 691; 1900.

[7]) van Tieghem, Bull. Soc. Bot. France 33, 216; 1886.

[8]) Robertson, Irvine und Dobson, Biochem. Jl 4, 258; 1909.

[9]) Ruhland, Zs Ver. D. Zuckerind. 1912, 1.

[10]) H. Collin, C. r. 160, 777; 1915.

3. Saccharase der Kryptogamen.

Hefen-Saccharase.

Vorkommen. Ein Rohrzucker hydrolysierendes Enzym dürfte sich in den meisten Hefen finden, sehr wahrscheinlich ausnahmslos in den Kulturhefen unserer Gärungsgewerbe und in den eigentlichen Weinhefen. Nach den meisten Verfassern wäre die Verbreitung der Hefensaccharase in einem noch viel grösseren Gebiet sichergestellt; indessen ist der Nachweis in der Mehrzahl der Fälle dadurch geführt worden, dass man die Fähigkeit der verschiedenen Hefen zur Vergärung des Rohrzuckers beobachtet hat[1]. Nimmt man mit Willstätter und Steibelt[2] an, dass Disaccharide auch direkt der Vergärung unterliegen können, so ist die Vergärung eines solchen Zuckers an sich kein Beweis mehr für die Gegenwart des betreffenden hydrolysierenden Enzyms.

Sicher muss man von denjenigen Hefen, welche Rohrzucker nicht, wohl aber Glukose, vergären, annehmen, dass sie keine Saccharase enthalten; nach Willstätter fehlt ihnen aber ausserdem die spezifische Rohzuckerzymase (oder ihr Co-Enzym).

Die Abwesenheit der Saccharase galt solchermassen als allgemein nachgewiesen in Saccharomyces apiculatus; indessen wies Klöcker 1913 nach, dass zahlreiche Apiculatus-Formen existieren, welche Rohrzucker vergären. Es wäre nunmehr noch festzustellen, ob in diesen Formen nur die Vergärung von Rohrzucker erfolgt oder ob dieselben freie Saccharase enthalten.

Über die Methodik der Saccharasebestimmung in frischen Hefen siehe S. 202. In der Tabelle S. 171 sind die hier untersuchten Hefen aufgenommen.

Isolierung der Saccharase.

Eine ausgezeichnete Kritik der Methoden zur Isolierung der Saccharase aus der Hefe verdankt man Willstätter, dessen Darstellung wir hier folgen.

Die verschiedenen Isolierungsmethoden unterscheiden sich im wesentlichen darin, dass nach den einen der Zellinhalt ohne enzymatischen Abbauvorgang von den Zellwänden bzw. von den festen und unlöslichen Bestandteilen der Zelle abgetrennt wird, während er nach den anderen Verfahren durch enzymatische Reaktionen chemisch verändert wird, ehe man ihn von den Heferesten entfernt.

Die erstgenannten Methoden (Michaelis, Meisenheimer) zielen darauf hin, durch Zerstörung der Zellstruktur die Saccharase, welche von der lebenden Hefe nicht an Wasser abgegeben wird, in Lösung überzuführen. Die Ergebnisse sind, wie Willstätter[3] betont, stets unbefriedigend, „weil sich die Saccharase in solchem geschützten Zustande oder derart mit hochmolekularen organischen Verbindungen vergesellschaftet vorfindet, dass sie nicht wasserlöslich ist".

---

[1] Siehe z. B. bezüglich Torula-Arten Will, Zbt. Bakt. (2) 21, 386, 459; 1908 und 34 1; 1912.

[2] Willstätter und Steibelt, H. 115, 211; 1921.

[3] Willstätter und Racke, Lieb. Ann. 425, 1; 1921.

V. Übersicht über die bis jetzt bestimmten Inversionsfähigkeiten verschiedener Hefen.

Nr.	Hefe	Zellenzahl per g Trokkengewicht	t	ccm	Rohrzucker g	Rohrzucker %	g	% Trokkeng.	Abs. Zellenzahl	k	Inv. (Mittel)
1.	Unterhefe H.	$0,16 \cdot 10^{11}$	17°	20—60	4—10	8—16	0,1—0,5	30	$0,05—0,65 \cdot 10^{10}$	$20—125 \cdot 10^{-4}$	$10 \cdot 10^{-12}$
2a.	Brennerei-Oberh. SB	$0,30 \cdot 10^{11}$	17°	60—100	5—10	8—10	0,2—1	30	$0,1—0,26 \cdot 10^{10}$	$7—27 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-12}$
2b.	„ R	$0,26 \cdot 10^{11}$	17°	60	4,8	8	0,3—0,4	25	$0,28—0,26 \cdot 10^{10}$	$35—46 \cdot 10^{-4}$	$8,5 \cdot 10^{-12}$
3.	Brau.-Oberh. Grönw.	—	17°	60	4,8	8	1 ccm Rohhefe		$0,24 \cdot 10^{10}$	$37,5 \cdot 10^{-4}$	$7,5 \cdot 10^{-12}$
4.	Brauerei-Unterh. „	—	17°	60	4,8	8	1 ccm Rohhefe		$0,22 \cdot 10^{10}$	$59,5 \cdot 10^{-4}$	$13,0 \cdot 10^{-12}$
5.	Lab. Kultur S. ellips.	$0,47 \cdot 10^{11}$	30°	100	10	10	0,29	(30)	$1,36 \cdot 10^{10}$	$65 \cdot 10^{-4}$	$4,8 \cdot 10^{-12}$
6.	Torula Hansen (Svb.)	$2,5 \cdot 10^{11}$	18°	100	8	8	—	—	$31,5 \cdot 10^{10}$	$40 \cdot 10^{-4}$	$0,11 \cdot 10^{-12}$
7.	Sacch. thermantiton	—	17°	60	4,8	8	—	—	$2,9 \cdot 10^{9}$	$30 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-12}$
		—	19°	100	8	8	—	—	$2,8 \cdot 10^{9}$	$25 \cdot 10^{-4}$	$7 \cdot 10^{-12}$
8.	Sacch. Marxianus	$0,72 \cdot 10^{11}$	17°	60	4,8	8	—	—	$0,76 \cdot 10^{10}$	$0,78 \cdot 10^{-7}$	$4,6 \cdot 10^{-14}$

1, 2a, 3—7 Euler, Svanberg und Laurin. — 2b und 8 Euler und Josephson.

„Die Methode, durch enzymatische Abbauvorgänge die Saccharase frei und löslich zu machen, lässt sich so gestalten, dass die frische Hefe unverdünnt der langdauernden Autolyse überlassen wird (C. O'Sullivan und F. W. Tompson[1])), oder dass sie dabei unter mässiger Verdünnung mit Wasser der Wirkung eines antiseptischen und abtötenden Mittels unterworfen wird (C. S. Hudson[2]), rapid autolysis)."

„Die Hefeverflüssigung durch abtötende Mittel bewirkt an sich keine Abgabe des Enzyms an Wasser. Und je nach dem dabei angewandten Zellgift werden die enzymatischen Vorgänge verschieden geleitet, so dass ... der chemische Apparat der Saccharasefreilegung entweder geschont (Toluol) oder geschädigt wird (Essigester); daher ist nur im ersteren Fall die durch Hefeverflüssigung beschleunigte Autolyse für die Saccharasegewinnung brauchbar."

Unter den angegebenen Methoden[3]) ist somit die beschleunigte Auto-

---

[1]) C. O'Sullivan und F. W. Tompson, Jl Chem. Soc. 57, 834; 1890.

[2]) C. S. Hudson und H. S. Paine, Jl Amer. Chem. Soc. 32, 774; 1910 — C. S. Hudson, ebenda 36, 1566; 1914.

[3]) Nach Willstätter ist die Vorbereitung der Hefe für die Extraktion durch Trocknung wertlos, insoweit sie durch Koagulieren der Eiweissstoffe das Lösen der Saccharase erleichtern soll. „Trocknung der Hefe und darauffolgendes Ausziehen mit Wasser kann brauchbare Saccharaselösungen liefern, wenn Schädigungen (höheres Erwärmen, Verweilen in wasserhaltigem Alkohol) vermieden und das Ausziehen der Hefe, was beachtet werden sollte, unter Bedingungen des enzymatischen Abbaues und mit genügend grosser Zeitdauer vorgenommen wird."

lyse weitaus am günstigsten. C. S. Hudsons Vorschrift ist neuerdings von Willstätter und Racke eingehend untersucht und noch verbessert worden.

Folgende Arbeitsweisen kommen nunmehr in Betracht:

1. Verfahren von Hudson (rasche Autolyse bei Anwendung von Toluol).

Die frische Presshefe wird in das gleiche bis doppelte Gewicht Wasser eingetragen, mit 5—10% ihres Gewichtes an Toluol vermischt und nach kräftigem Durchschütteln, das man alle Tage wiederholt, bei Zimmertemperatur etwa 7 Tage der Autolyse überlassen. Nach wenigen Stunden setzt unter beträchtlicher Gasentwickelung Selbstgärung ein, die bis zum folgenden Tage beendet ist. Nach einer Woche filtriert man die Hefeflüssigkeit ab. Der abfiltrierte Auszug beträgt etwa 1400 ccm für 1 kg 20—22%iger Frischhefe (oder bei Anwendung von 2 Teilen Wasser 2100 ccm), d. i. ungefähr 80% der entstandenen Hefeflüssigkeit, und sein Trockengewicht 85—123 g. Den Zeitwert (vgl. S. 200) fanden Willstätter und Racke 160—206 bei Anwendung von Brauereihefen vom Zeitwert 230—350.

Bei der hierauf folgenden Behandlung der Saccharaselösung mit Bleiazetat zur Entfernung von Eiweisskörpern ist es zweckmässig, einen grösseren Bleiüberschuss zu vermeiden, indem man Tüpfelproben mit Schwefelammonium macht. Wenn die Flüssigkeit schon ein wenig Blei enthält, gibt sie zwar noch etwas mehr Fällung mit weiterem Bleiazetat, erfordert aber nur noch wenig davon. Der Eiweissniederschlag ist reichlich und gut filtrierbar. Das Filtrat gibt mit Schwefelwasserstoff nur ein wenig kolloides Bleisulfid, das mit spanischer Klärerde koaguliert und abfiltriert wird.

2. Verfahren der raschen Autolyse mit (Essigester +) Toluol unter Neutralisieren mit Ammoniak oder Ammonphosphat nach Willstätter und Racke.

Das Verfahren hat den Vorzug günstigerer Saccharaseausbeute und etwas grösserer Reinheitsgrade. Die Frischhefe wird nach dem Eintragen in das gleiche (oder doppelte) Gewicht Wasser durch Versetzen mit Toluol und Essigsäureester (je 50 ccm auf 1 kg) verflüssigt. Willstätter beginnt bald die auftretende Säure mit verdünntem Ammoniak zu neutralisieren und vervollständigt die Neutralisation in den ersten Stunden oft und weiterhin am ersten Tage noch einige Male. Die Auflösung der Saccharase erfordert 3—4 Tage. Um die Enzymlösung filtrierbar zu machen, muss man sie mit Essigsäure neutralisieren, wodurch ein sehr starker Eiweissniederschlag entsteht, und lässt noch eine Stunde lang stehen. Dann lassen sich ungefähr 1500 ccm (aus 1 kg Hefe mit gleichem Gewicht Wasser) abfiltrieren mit meistens grösserem Saccharasegehalt, als derjenige der Hefe war, und mit einem Trockengewicht von 57—85 g. Der Zeitwert einer solchen Lösung, auf Trockenrückstand bezogen, betrug 114—142. Die weitere Reinigung zeigt keinen Unterschied gegenüber dem Hudsonschen Verfahren. Durch die Fällung mit Bleiazetat verminderte sich das Trockengewicht auf 47 (in mehreren Beispielen), während sich der Zeitwert auf 70—90 verbesserte.

Die Anwendung von Ammoniumphosphat ist gleichmässiger, die Autolysenflüssigkeit in diesem Falle schon ohne Behandlung mit Essigsäure besonders gut filtrierbar, Reinheitsgrad und Saccharaseausbeute pflegen höher zu sein. Man verwendet für 1 kg Frischhefe 25 g $(NH_4)_2HPO_4$. Die filtrierte Saccharaselösung wird entweder direkt mit Bleiazetat von Phosphorsäure und Proteinen befreit oder man fällt zuerst mit Magnesiumchlorid die Phosphorsäure aus und enteiweisst das Filtrat mit Bleizucker, in diesem Fall mit einer viel geringeren Menge.

Saccharaselösung aus Trockenhefe. Willstätter trocknet zwecks gleichmässigerer Verarbeitung zunächst die einzelnen Hefelieferungen an der Luft und vermischt sie dann. Die gemahlene Trockenhefe wird mit der zehnfachen Menge Wasser und der ihr gleichen oder halben Menge Toluol vermischt und 2—3 Tage bei Zimmertemperatur gerührt oder an der Maschine geschüttelt. Auch bei der entwässerten Hefe bezeichnet Willstätter die Neutralisation als eine Verbesserung und Abkürzung des Verfahrens.

3. Rasche Autolyse mit Essigester und Toluol ohne Neutralisation. Im hiesigen Laboratorium hat sich folgendes einfache Verfahren bewährt: Die frische eventuell durch Gärung vorbehandelte Hefe (80% Wassergehalt) wird mit Toluol und dem von Willstätter vorgeschlagenen Essigester (sowie eventuell mit NaCl) während 4 Tagen verflüssigt. Filtration durch viele Faltenfilter. Ausgehend von Hefe vom mittleren Zeitwert 250 gelangen wir zu einem Saft $\pm 0 = 110$ bis 120, also If$=0{,}4$, wobei etwa 70% des Gesamtsaccharasegehaltes der Hefe gewonnen werden. Von der Bleiazetatfällung sind wir abgegangen, da sie keinen besonderen Vorteil zu bieten scheint.

Allgemeines über Reinigung der Saccharasepräparate.

1. Verfolgung der Reinigungsarbeit. Sowohl beim Ausarbeiten von Reinigungsverfahren als bei der Reinigung von Lösungen zu präparativen Zwecken ist es unerlässlich, die Wirksamkeit der Substanz per Gewichtseinheit ständig zu verfolgen. Die Masseinheiten der Saccharase findet man S. 200 u. ff. ausführlich besprochen, nämlich den „Zeitwert" nach O'Sullivan und Tompson, die „Inversionsfähigkeit" nach Verf. und Svanberg, sowie den „Menge-Zeit-Quotienten", M. Q. Z. nach Willstätter.

Reinigung durch Adsorption. Verf. und Kullberg[1]) haben nach der Bleiazetatbehandlung die weitere Reinigung mit Kaolin vorgenommen, da, wie Michaelis[2]) gefunden hatte, Kaolin zwar Proteine, nicht aber Saccharase adsorbiert.

Hinsichtlich des Verhaltens von Kaolin zu Saccharase haben neuerdings Willstätter und Racke (l. c.) die wichtige Beobachtung gemacht, dass zwar unreine Saccharase tatsächlich von Kaolin nicht adsorbiert wird, während bei höheren Reinheitsgraden das Enzym von Kaolin gebunden wird.

---

1) Euler und Kullberg, H. 73, 335; 1911.

2) Michaelis, Biochem. Zs 7, 488; 1907.

Dass die erste Behandlung von Saccharaselösungen, auch von solchen, welche durch rasche Autolyse nach Hudson dargestellt sind, ohne Verlust von Saccharase möglich ist, wird von Willstätter bestätigt. Aber diese Behandlung fand Willstätter ungenügend.

Wie der genannte Forscher betont, liegen die Enzyme nicht als reine Stoffe vor. „Man findet sie in den . . . Auszügen mit einem grossen Vielfachen komplizierter organischer Verbindungen vergesellschaftet, nicht einfach im Zustand eines Gemisches, sondern durch Kräfte verbunden, wie sie auch in den Adsorptionsverbindungen mit unlöslichen Adsorbentien wirken.“ Die Begleitstoffe der Saccharase in den Hefenauszügen sind ihrer Zusammensetzung nach durchaus nicht konstant, sondern man kann die Autolyse des Pilzprotoplasmas verschieden leiten, so dass die Natur der amphoteren Stoffe aus der Klasse der Proteine und Proteinabbauprodukte ungemein schwankt. Davon ist das Verhalten gegen Adsorbentien und im Adsorbate abhängig. „Daher sagt die Adsorptionsanalyse oder die elektrische Überführung über die Natur eines Fermentes nichts aus, sondern sie lässt nur erkennen, ob in dem aus einem Ferment und seinen jeweiligen Begleitstoffen gebildeten Additions- oder Adsorptionsprodukt die Säure- oder Basennatur überwiegt.“

Einen gewissen Erfolg hinsichtlich der selektiven Adsorption hatte Kullberg[1]) mit kolloider Eisenlösung erzielt; indessen blieb die Ausbeute bei seinen Vorversuchen gering. Als diese Versuche im hiesigen Laboratorium sowohl mit kolloider Eisenlösung als mit Aluminiumhydrat wieder aufgenommen werden sollten, hat die Methode in den Händen von Svanberg[2]) zu keinem Erfolg geführt. Dagegen ist es Willstätter und Racke gelungen, gerade durch die Anwendung von Aluminiumhydroxyd wesentliche Fortschritte in der Reinigung von Saccharaselösungen zu erzielen. Die genannten Forscher fanden, ausgehend von Willstätters Erfahrungen an Peroxydasen, dass die Adsorption der Saccharase vervollkommnet wird, wenn man ein Lösungsmittelgemisch, besonders wässerig-azetonige Lösungen, anwendet. „Mit dreimal weniger Adsorbens entstehen Adsorbate, in denen das Verhältnis von Invertin zum Trockenrückstand dreimal günstiger ist als bei der Adsorption aus wässeriger Lösung.“

Auch über die Zerlegung von Adsorbaten haben Willstätter und Racke wesentliche Tatsachen gefunden; sie bezeichnen die Zerlegung der Adsorbate als „Elution“; diese beruht „auf der Überwindung der kleinen Affinitätsbeträge, die in den Adsorbaten wirken, durch etwas stärkere Affinitäten“. Diese Elution ist ihnen in zweierlei Weise gelungen, nämlich einerseits durch schwache Alkalien, besonders Ammoniak von 0,01—0,1 % bzw. sekundäre Alkaliphosphate, andererseits durch Rohrzucker.

---

[1]) Euler und Kullberg, H. 73, 335; 1911.

[2]) Euler und Svanberg, H. 107, 269; 290; 1919.

„Die Zusammensetzung und demzufolge das Verhalten der Adsorbate ist von den Bedingungen ihrer Bildung abhängig. Wenn das Invertin aus dem wässerigen Hefeauszug bei Gegenwart von Ammoniak adsorbiert wird, ... so verhält sich das Adsorbat anders als nach der Darstellung aus ammoniakfreier, am besten azetonhaltiger Lösung. Das Invertin ist im ersteren Falle aus dem Adsorbat gar nicht durch Ammoniak eluierbar. Dem Adsorbat fehlen entweder Stoffe, die beim Eluieren mitwirken, oder es enthält zusammen mit dem Invertin Stoffe, die es fester an das Aluminiumhydroxyd binden."

Begleitstoffe beider Art kommen in den Adsorbaten vor; Willstätter unterscheidet sie als „Koadsorbientien" und „Koeluentien".

Zur Deutung der gefundenen Tatsachen nimmt Willstätter an, dass das Adsorbendum an das Adsorbens sowohl unmittelbar gebunden, wie auch durch Vermittlung eines Koadsorbens gebunden auftritt; die verschiedenen Fälle werden durch folgende Formeln zum Ausdruck gebracht:

I. Enzym
/ Koadsorbens ···· Adsorbens
\ Koeluens
(eluierbar durch Ammoniak)

II.
Enzym · Koadsorbens ··· Adsorbens
(nicht eluierbar durch Ammoniak)

III.
Enzym · Adsorbens
(eluierbar durch Ammoniak)

In diesem Zusammenhang möge hier

das Verhalten der Saccharase zu Sorptionsmitteln

näher beschrieben werden.

Bei der Sorption von Enzymen an festen Oberflächen handelt es sich, wie im I. Teil, S. 80 u. ff. betont wurde, im allgemeinen um chemische Reaktionen. Vermutlich werden dabei schwach saure oder schwach basische Gruppen des Enzympräparates neutralisiert. Über solche Oberflächenreaktionen zwischen chemisch definierten Stoffen ist noch wenig bekannt, so dass die Anwendungen der Sorption zur Reinigung von Saccharaselösungen noch rein empirisch sind. Wegen der allgemeinen Bedeutung der Sorptionsvorgänge für die Enzymchemie gehen wir hier näher auf die besonders durch Willstätter bekannt gewordenen Tatsachen ein.

Allgemeines.

Wirksamkeit des Enzyms im Adsorbat. Michaelis[1]) hat zuerst nachgewiesen, dass die Saccharase im Zustand der Adsorptionsverbindung noch wirksam ist. Dieses Ergebnis konnte sowohl Verf. als Willstätter durchaus bestätigen.

In den Adsorbaten ist die Saccharase nach Willstätters Befund

---

[1]) Michaelis, Biochem. Zs 7, 488; 1907/08.

meistens weniger beständig als in Lösung und es ist ungleichmässig beständig. Siehe auch S. 192.

Adsorptionswert. Das Adsorptionsvermögen eines Adsorptionsmittels für Saccharase kann man nach Willstätter durch den „Adsorptionswert" ausdrücken.

„Adsorptionswert" ist die Menge Rohrzucker in Gramm, die in 16%iger Lösung, enthaltend 1% NaH_2PO_4, von 1 g des unter bestimmten Bedingungen mit Saccharase gesättigten Adsorbens bei 15,5° in 1 Minute zur Nulldrehung invertiert wird.

Willstätter gibt für die Sorption an $Al(OH)_3$ folgendes Beispiel an (l. c. S. 67): Von der mit Saccharase gesättigten Aluminiumhydroxydsuspension wirkten 2,5 ccm, enthaltend 0,0638 g $Al(OH)_3$, auf 4 g Rohrzucker unter den Bedingungen der Zeitwertdefinition. Da gemäss der gefundenen Nulldrehungszeit von 35 Minuten für 1 g Aluminiumhydroxyd 35 · 0,0638 Minuten nötig wären, um 4 g Rohrzucker zu 75,75% zu spalten, so würden in 1 Minute $\frac{4}{35 \cdot 0,0638} = 1,787$ g Zucker auf 0° invertiert.

Hält man sich an die Aktivität der Enzymlösung vor und nach der Sorption, was gewisse Vorteile bietet, so kann man die Inversionseinheiten (gemessen durch die Inversionskonstanten k) angeben, welche durch 1 g Sorbens unter gegebenen Bedingungen aus der Lösung entfernt werden.

Die wichtigsten Sorptionsmittel.

1. Metallhydroxyde. Das angewandte Aluminiumhydroxyd wird aus reinem Aluminiumsulfat oder Ammonalaun dargestellt[1]). Die siedende Lösung des Aluminiumsalzes wurde in dünnem Strahl in 15%iges Ammoniak eingetragen, das im Emailtopf durch Einleiten von Dampf erhitzt und weiter mindestens 1 Tag im Kochen erhalten wurde. Wenn nach dem Auswaschen durch Dekantieren, was 1 Woche zu dauern pflegt, mit Nesslers Reagens keine Färbung mehr entsteht, so bildet das Aluminiumhydroxyd eine zähe, plastische Masse, und verteilt sich zum Teil kolloidal. Das Adsorbens ist dann gut brauchbar, selbst wenn es noch Spuren von SO_4-Ion enthält. Um auch diese noch zu entfernen, muss man ein zweites Mal mit Ammoniak erhitzen und dies, da man nicht mehr dekantieren kann, so lange fortsetzen, bis die Flüssigkeit ammoniakfrei ist. Das so dargestellte Hydroxyd erwies sich erheblich wirksamer als Handelspräparate.

Zur Trennung der Saccharase von Verunreinigungen hat es sich in Willstätters Untersuchungen als zweckmässig erwiesen, die Sorption nicht in Wasser, sondern in wässrig-alkoholischer oder noch besser in wässrig-azetonischer Lösung vorzunehmen. Mit dreimal weniger Adsorbens entstehen Adsorbate, in denen das Verhältnis der Saccharase zum Trockenrückstand dreimal günstiger ist als bei der Adsorption aus wässriger Lösung.

---

[1]) Siehe hierzu auch Willstätter, Lieb. Ann. 422, 47 u. zw. 72; 1920/21.

Ferner wurde die Erfahrung gemacht, dass eine bestimmte Sorte Aluminiumhydroxyd unter verschiedenen Bedingungen, z. B. in wässriger oder azetonig-wässriger Lösung ungefähr gleiche Stoffmengen, aber verschiedene Mengen Enzym adsorbiert. Daher wird die Saccharase in desto reinerem Zustand erhalten, je weniger Aluminiumhydroxyd man braucht, um eine gegebene Menge desselben zu adsorbieren.

Die Adsorption wurde von Willstätter gewöhnlich bei schwach saurer Reaktion der Saccharaselösung vorgenommen.

Eine Versuchsreihe von Myrbäck mit einer Saccharaselösung vom If-Wert 7 ergab bezüglich des Aziditätseinflusses folgende Zahlen (10 ccm Enzymlösung + 0,009 g $Al(OH)_3$ in 3 ccm):

pH	3,25	3,75	4,45	6,25	7,7	ca. 9
% adsorb. Saccharase . .	30	46	78	89,3	71	46,5

Es zeigte sich also ein ausgesprochenes pH-Maximum der Aktivität bei etwa 6.

Im angeführten Versuch würden von 0,01 g $Al(OH)_3$ aus der untersuchten Lösung etwa 0,014 Inversionseinheiten adsorbiert werden können.

Elution.

Dass Rohrzucker eine besondere eluierende Fähigkeit besitzt, wurde von O. Meyerhof[1]) entdeckt, welcher Saccharase aus seiner Verbindung mit Eisenhydroxyd durch Rohrzuckerlösung freimachen konnte. Es scheint aber nach den Studien von Willstätter[2]) und Michaelis[3]), dass die ablösende Wirkung des Rohrzuckers nicht streng spezifisch ist und ferner, dass keineswegs ein Enzym allgemein von seinem Substrat eluiert wird.

Elution mit verschiedenen Mitteln. Das Adsorbat von Saccharase an Aluminiumhydroxyd gibt an reines Wasser kein Enzym ab, auch nicht an kohlensäurehaltiges und mit Essigsäure angesäuertes. Eluentien sind in erster Linie Rohrzucker, der das Adsorbat quantitativ zerlegt. In zweiter Linie schwache oder sehr verdünnte Basen, am besten schwach alkalisch reagierende Salze, welche einen pH-Wert von etwa 8—10 und eine erhebliche potentielle Alkalinität erzeugen, besonders sekundäre Alkaliphosphate. Am vollständigsten eluiert eine Lösung, welche Rohrzucker und Phosphatpuffer enthält.

Die Affinität des Rohrzuckers zur Saccharase geht aus kinetischen Tatsachen hervor; auch bei den von Hedelius[4]) ausgeführten Diffusionsversuchen bestand die Absicht, sie in Erscheinung treten zu lassen.

Die Elution der Adsorbate fällt verschieden aus, je nach den Bildungsbedingungen der Adsorbate und je nach der Entstehung der Saccharaselösung;

[1]) Meyerhof, Pflüg. Arch, 157, 251; 1914.
[2]) Willstätter und Racke l. c. — Willstätter und Kuhn, H. 116, 53; 1921.
[3]) Michaelis, Biochem. Zs 115, 269; 1921.
[4]) Euler und Hedelius, H. 110, 190; 1920.

wegen der Einzelheiten muss auf die Originalarbeit verwiesen werden. Die Begleitstoffe der Saccharase wirken bei ihrer Sorption und noch viel mehr bei der Elution aus dem Adsorbate mit, wie bereits bei der Beschreibung des Reinigungsverfahrens erwähnt wurde (Willstätter).

$Cu(OH)_2$. Kupferionen üben auf Saccharase eine verhältnismässig schwache Giftwirkung aus[1]), welche durch H_2S vollständig aufgehoben werden kann. Die Sorption von Saccharase an $Cu(OH)_2$ versprach den Vorteil, dass das Adsorbens sich (durch Schwefelwasserstoff) aus der Lösung entfernen lässt, wodurch das langwierige Elutionsverfahren vermieden würde. Indessen wird Saccharase auch durch CuS zurückgehalten.

Auch Versuche, frischgefälltes HgO als Sorbens zu verwenden[2]) haben bis jetzt zu keinem brauchbaren Resultat geführt.

2. Kaolin. Das fein verteilte Handelspräparat wird geeignet einige Stunden in 20%iger Salzsäure ausgekocht und dann bis zum Verschwinden der Chlorreaktion mit destilliertem Wasser ausgewaschen.

Die aus dem Tonerdeadsorbat eluierte Saccharase, und zwar erst diese, ist adsorbierbar durch Kaolin. Durch die Behandlung mit Aluminiumhydroxyd ist das Enzym von den Koadsorbentien abgetrennt worden, mit denen es zuvor assoziiert war. Es zeigt in diesem Reinheitsgrad das Verhalten eines amphoteren Stoffes und wird nun sowohl von elektronegativen wie elektropositiven Adsorbentien aufgenommen (Willstätter).

Es ist nicht nötig, die Adsorption wie beim Aluminiumhydroxyd durch Beimischung von Azeton oder Alkohol zu befördern; die Saccharase ist auch schon so arm an Schutzstoffen, dass sie in den organischen Lösungsmitteln rasch verderben würde. Die Sorptionsfähigkeit des Kaolins für Saccharase geht aus folgendem Versuch von Willstätter und Racke hervor:

Lösung (mit NH_3 dargestellt und einige Tage dialysiert, neutrale Reaktion M.Z.Q. 0,7; enthält 0,25 g Trockensubstanz in 130 ccm), gab an 10 g Kaolin 84% der Saccharase ab und verlor auf weiteren Zusatz der gleichen Menge die Saccharase gänzlich.

Aus dem Kaolinadsorbat lässt sich die Saccharase durch sekundäres Alkaliphosphat, Natriumkarbonat oder Ammoniak eluieren, am besten durch Suspendieren des Adsorbates in Wasser und Versetzen mit so viel 0,2 n-Sodalösung, bis die Flüssigkeit alkalisch zu reagieren beginnt. Das Kaolin wird dabei zum Teil kolloid und die Elution ist kaum filtrierbar. Die Klärung wird erreicht, indem man die Hauptmenge des Kaolins mit der Zentrifuge abtrennt und die trübe Elution auf der Nutsche durch eine Schicht von geglühtem Kieselgur absaugt. Dabei tritt kein Verlust an Saccharase ein. Die Ausbeuten leiden, wenn die Kaolinadsorbate nicht rasch genug verarbeitet werden, da das Enzym in ihnen allmählich in unwirksame Form übergeht.

---

[1]) Euler und Svanberg, Fermentf. 4, 90; 1920.
[2]) Euler und Svanberg, H. 114, 137; 1921.

3. Kohle. Michaelis und Ehrenreich[1]) fanden, dass Saccharase von Kohle sowohl aus alkalischer als in neutraler oder saurer Lösung adsorbiert wird. Die Bindungsverhältnisse zwischen Saccharase und Kohle haben anschliessend hieran A. Eriksson[2]) sowie Nelson und Griffin[3]) untersucht. Was die gefundenen quantitativen Beziehungen betrifft, so bleibt abzuwarten, ob sich dieselben für reinere Enzymlösungen bestätigen.

Bemerkenswert ist Erikssons Angabe, dass er eine bedeutende Elution der Saccharase durch Rohrzucker erzielt hat. Die abweichenden Resultate von Nelson und Griffin können wohl durch Verschiedenheiten der in der Lösung in grossen Mengen vorhandenen Verunreinigungen veranlasst sein.

Organische Sorptionsmittel. Mastix ist nach Michaelis und nach Willstätters Befunden unwirksam. Die Sorption der Saccharase durch Kollodium ist bei der Verwendung von Kollodiumsäcken zur Dialyse sehr hinderlich. Einige Versuche von Myrbäck haben folgende Resultate ergeben:

1. Eine rohrzuckerhaltige Saccharaselösung (Zeitwert rund 5 Min) ergab eine Inversionskonstante $k \cdot 10^4 = 38$. In 50 ccm dieser Lösung wurde ein frisch hergestellter Kollodiumschlauch gewöhnlicher Grösse (Gesamtoberfläche beider Seiten 175 qcm) in zerschnittenem Zustand suspendiert. Nach etwa 12 Stunden war die Inversionskonstante $k \cdot 10^4$ auf 18 gesunken; sie änderte sich dann nur wenig, nämlich in einem Tag auf 17. Wurde nun aber in der so behandelten Enzymlösung ein neuer Kollodiumschlauch gleicher Grösse suspendiert, so trat offenbar keine Sorption mehr ein; nach 24 Stunden war $k \cdot 10^4 = 17$.

2. Ein Kollodiumschlauch, welcher zur Dialyse von Saccharaselösung bereits angewandt worden war, wurde in 50 ccm einer Enzymlösung wie die unter 1 beschriebene suspendiert. Innerhalb 24 Stunden sank $k \cdot 10^4$ von 38 auf 30, nach weiteren 24 Stunden auf 26 (offenbar durch Sorption an der Aussenseite). Diese Lösung, mit einem neuen Kollodiumschlauch 1 Tag stehen gelassen, ergab innerhalb der Versuchsfehler die gleiche Konstante, $k \cdot 10^4 = 27$.

Es scheint, dass Saccharase in gereinigtem Zustand nicht sorbiert wird, sondern nur dann, wenn sie mit fremden sorbierbaren Gruppen (Koadsorbentien nach Willstätter) behaftet ist.

Im folgenden werden einige Beispiele angegeben, welche zeigen, in welcher Weise Willstätter und Racke die Tonerde-Sorption anwenden.

Das Ausgangsmaterial war ein durch rasche Autolyse unter Toluolzusatz (1 Tl. Hefe, 2 Tle. Wasser) gewonnener Hefeauszug vom Zeitwert 250 (auf

[1]) Michaelis und Ehrenreich, Biochem. Zs 10, 283; 1908.
[2]) Eriksson, H. 72, 313; 1911.
[3]) J. M. Nelson und Griffin, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 1109; 1916.

die Hefe bezogen). 14,75 l wurden mit 5,9 l, d. h. 40% Azeton vermischt und mit 1,5 kg gemahlenem Kaolin einige Minuten verrührt und über Nacht stehen gelassen. Dann konnte ein grosser Teil der Flüssigkeit abgehebert werden, der Rest wurde filtriert. Hierbei gingen 10% der Saccharase verloren. Vom Filtrat (16 l) diente ein Anteil von 2,7 l zur Bestimmung der Tonerdemenge, die für die Adsorption von etwa 90% der Saccharase erforderlich war, und die Hauptmenge (13,5 l; M.Z.Q. 52,3) wurde dann in fünf ebenso grossen Anteilen mit Aluminiumhydroxyd bearbeitet. Von 8,3 g Aluminiumhydroxyd wurden in der Vorprobe 71% der Saccharase adsorbiert; danach war vom Adsorbens etwa 20% mehr anzuwenden. Die 5 Portionen wurden mit Aluminiumhydroxydsuspension, jede 10,7 g $Al(OH)_3$ enthaltend, in dünnem Strahl unter ständigem Umschütteln versetzt und eine halbe Stunde stehen gelassen. Das Adsorbens nahm nun 88% der Saccharase auf.

Vom Adsorbat lässt sich die Mutterlauge zum grossen Teil dekantieren. Die übrig bleibende Suspension (4 l) wurde verarbeitet in einer Zentrifuge von 2 l Gläserinhalt. In den Zentrifugengläsern wurde das gesammelte Adsorbat dreimal gewaschen durch Anrühren mit destilliertem Wasser und erneutes Zentrifugieren. Das in einen Kolben übergespülte Tonerdeadsorbat, dessen Suspension 1700 ccm betrug, wurde unter kräftigem Schütteln mit $5\frac{1}{2}$ ccm 10%igem Ammoniak versetzt. Die rasch gebildete Elution wurde zum Teil auf einige Nutschen gegeben und auf gehärtetem Filtrierpapier abgesaugt, zum Teil in der Zentrifuge annähernd geklärt und auf die nämlichen Filter nachgefüllt, da die ammoniakalische Elution durch Zentrifugieren allein nicht klar erhalten und danach für sich allein nicht klar filtriert werden konnte. Auch das fast wasserklare Filtrat pflegte noch etwas kolloides Aluminiumhydroxyd zu enthalten, das erst bei starkem Einengen ausflockte. Die Arbeit muss so geleitet werden, dass man in einem Tage bis zum Absaugen der Hauptmenge der Elution kommt, wenn auch nicht mehr zum Nachwaschen auf der Nutsche.

Man kann die Saccharase auch quantitativ mit Aluminiumhydroxyd adsorbieren, aber dieses Verfahren führt nicht ebenso sicher zu den hohen Reinheitsgraden des Enzyms.

Verarbeitung gealterter Autolysenflüssigkeit. Besonders einfach und günstig gestaltete sich die Verarbeitung von Hefeauszügen, die lange Zeit aufbewahrt wurden. Die Fortdauer proteolytischer Vorgänge scheint zu bewirken, dass der Hefeauszug an Begleitstoffen, die der Saccharase anhaften, namentlich an höheren Proteinen, ärmer wird. Solche gealterte Autolysenflüssigkeit bedarf keiner Vorbehandlung mit Kaolin.

10 l eines 7 Monate alten Hefenauszuges vom Zeitwert 400 wurden mit 4 l Azeton vermischt, wobei ungewöhnlich wenig Eiweissfällung auftrat, und nach dem Filtrieren mit Aluminiumhydroxyd behandelt. Hier genügte $\frac{1}{3}$ der gewöhnlich für ebensoviel Saccharase anzuwendenden Menge, nämlich 11,3 g, zum quantitativen Adsorbieren der Saccharase. Die ammoniakalische

Elution enthielt nach dem Einengen etwa 40%, aber das mit Azeton gefällte und getrocknete Präparat nur noch etwa 25% von der Saccharase des Hefeauszugs. Die Ausbeute betrug 0,426 g, der Zeitwert (nach der teilweisen Zersetzung) 1,0.

Adsorption mit Kaolin.

Die Saccharase in der ammoniakalischen Elution aus dem Tonerdeadsorbat wird von Kaolin vollständig aufgenommen. Die erforderliche Kaolinmenge ist aber weit geringer, und der Reinheitsgrad des Enzyms lässt sich höher steigern, wenn zuerst die Elution eingeengt und mit Azeton gefällt wird. Der Adsorption mit Kaolin wird die Saccharase am besten in schwach essigsaurer Lösung unterzogen.

Es wurden 3,83 g Saccharase vom Zeitwert 4,8 (M.Z.Q. 16,3) verarbeitet. Das Präparat wurde mit wenig Wasser angerieben und in 100 ccm gelöst. Die trübe Flüssigkeit gab nach Filtrieren auf Zusatz von 2,5 ccm 2 n-Essigsäure, und noch mehr beim Stehen, flockige Niederschläge, die starke Xanthoproteinreaktion zeigten. Nach wiederholtem Filtrieren enthielt die Lösung noch 8% der angewandten Saccharase (M.Z.Q. 13,6). Nach Verdünnen auf 800 ccm wurde mit 83 g Kaolin (vorbehandelt mit kochender Salzsäure) vollständige Adsorption erzielt. Das Adsorbat wurde sogleich in der Zentrifuge von der Mutterlauge getrennt, worin hauptsächlich Hefegummi zurückblieb, und mehrmals mit Wasser gewaschen. Hierauf wurde es mit 1 l Wasser suspendiert und unter Schütteln wurden 11 ccm 0,2 n-Sodalösung bis zur eben beginnenden alkalischen Reaktion zugefügt. Das Natriumkarbonat wird vom Kaolin aufgenommen, das dabei das adsorbierte Enzym freigibt. Die vom Kaolin abzentrifugierte Lösung war ganz trüb; sie wurde durch Schütteln mit 50—100 g Kieselgur klar und ohne Verlust filtrierbar. Die Elution enthielt 68% (M.Z.Q. 9,25) von der angewandten Saccharase (der filtrierten Lösung) und ihr Gehalt blieb bei den folgenden Operationen, Eindampfen und Dialyse, konstant, was sonst nicht der Fall war.

Die mit Essigsäure ganz schwach angesäuerte Elution wurde im Faust-Heimschen Trockenapparat auf 300 ccm eingeengt und von dem dabei auftretenden Niederschlag unter Zusatz von Kieselgur abfiltriert.

Nach dreitägiger Dialyse durch Fischblasen betrug M.Z.Q. der Lösung wieder 9,25.

Wurde die Lösung nun im Faust-Heim-Apparat zur Trockne eingedampft, so erhielt man die Saccharase als eine spröde, pulverisierbare Masse, vom Zeitwert 0,86.

Willstätters Elutionsausbeute war in anderen Fällen weniger günstig. 17,62 g Saccharase vom Zeitwert 4,7 bildeten mit 270 g Kaolin das Adsorbat, welches mit 1,8 l Wasser unter Zusatz von 80 ccm 0,2 n-Natriumkarbonat eluiert wurde. Die mit Kieselgur geklärte, auf Lackmus neutral reagierende

Elution (M.Z.Q. 30) enthielt 40% der Saccharase, die beim Einengen und mehrtägigem Stehen auf 31% (M.Z.Q. 23) zurückging. Von da an war das Enzym beständig, auch bei sehr langem Stehen seiner Lösung.

Vorschrift zur Reinigung von Saccharase-Lösungen und Präparaten.

Die folgende Anleitung zur Reinigung stützt sich im wesentlichen auf die Angaben von Willstätter und Racke und die Erfahrungen aus dem hiesigen Laboratorium.

Es ist bereits auf Seite 173 erwähnt worden, dass die schnelle Autolyse unter Zusatz von Toluol und Essigester sehr wirksame Säfte liefert; wir kommen mit unserer Stockholmer Hefe in der Regel auf Säfte vom Zeitwert 110—120, also If = 0,4.

Die von Hudson und früher auch im hiesigen Laboratorium angewandte Reinigung durch Bleiacetat ist nach unseren Erfahrungen nicht erforderlich; man kann diese Manipulation einsparen, ohne dass sich der Gang und Erfolg der späteren Reinigung dadurch ändert.

Manchmal wurde der frische Autolysesaft mit guter Tierkohle behandelt (G. Ericson) und zwar mit 10—12 g Kohle auf 100 ccm Saft. Dann stieg If von 0,35 auf 0,45; bei schlechten Autolysesäften war der Effekt grösser.

Im allgemeinen besteht die erste Operation unseres Reinigungsverfahrens in einer

1. Alkohol-Fällung. In 96prozentigen Alkohol wird unter Umrühren und Abkühlen das gleiche Volumen, beispielsweise 5 Liter Autolysesaft eingetragen. Die ziemlich starke Fällung wird nach etwa 1/2 Stunde durch Dekantieren und Filtrieren entfernt. Das Filtrat enthält so gut wie keine Saccharase.

Die Fällung, welche 90—95% vom Saccharasegehalt S des Autolysesaftes enthält, wird in 2,5 Liter entweder reinen Wassers oder 20prozentigen Alkohols aufgeschlämmt, einige Stunden lang geschüttelt und dann filtriert.

Es werden ungefähr 90% der ursprünglichen Saccharasemenge S zurückgewonnen.

Durch Fäulnisbakterien kann das Eiweiss der Alkoholfällung teilweise entfernt werden (Gösta Ericson).

Der Vorteil dieser einleitenden Alkoholfällung besteht besonders darin, dass die folgende Adsorption mit weniger Tonerde ausgeführt und das Adsorbat leichter durch Filtration von der Lösung getrennt werden kann.

Die Lösung versetzen wir nun unter Abkühlen mit 20—35% Alkohol, wodurch das Gesamtvolumen also auf etwa 3,3 Liter steigt.

2. Tonerde-Sorption. Von dem nach Willstätter und Racke bereiteten Aluminiumhydroxyd verwenden wir per Liter Saccharaselösung 15—20 g in 1/2 Liter suspendiert, also in unserem Beispiel 45—60 g in etwa 1,5 Liter Wasser. Die Sorption verläuft während etwa 1/2stündigen Umrührens

der Mischung. Hierauf wird dekantiert und unter Saugen filtriert. Das Adsorbat wird mehrmals mit kaltem Wasser gewaschen. Bei Anwendung der obigen Tonerdemengen sind die Sorptionsverluste gering, die Fällung enthält noch rund 90 % von S.

3. Zur Elution dieses Sorbates verwenden wir 2 l 10—15prozentige Rohrzuckerlösung, welche 1 % primäres Phosphat enthält. Nach einstündigem Schütteln wird filtriert, was durch Zusatz von Filtrierpapier erleichtert wird. Das Filtrat enthält nun noch 70—80 % von S, bei einzelnen Versuchen 90 %.

4. Erste Dialyse. Die Verluste, welche durch die hierauf folgende Dialyse eintreten, sind stark abhängig vom Material der Dialysierschläuche. Mit Kollodiummembranen konnten manchmal grössere Verluste vermieden werden. Der Zeitwert der sich nun ergebenden Lösungen schwankte zwischen 2 und 7 Min., If demgemäss zwischen 6 und 25. War die Reinigung mit Alkoholfällung eingeleitet worden, so wurden hier im allgemeinen günstigere Werte erhalten.

5. Kaolinsorption. Das Volumen der Saccharaselösung betrug nun rund 2 Liter. Nach Willstätters Vorschrift wird nun mit Essigsäure angesäuert, worauf etwa 75 g Koalin eingerührt werden und mit der Lösung etwa ½ Stunde unter Schütteln in Berührung bleiben. Das Kaolinsorbat wird nun durch Dekantieren und Zentrifugieren von der Lösung befreit und hierauf mit Wasser gewaschen.

6. Zweite Elution. Das Kaolin-Sorbat wird in etwa 500 ccm Wasser suspendiert, welches danach durch Soda oder Ammoniak auf pH = 9 gebracht wird und während 1 Stunde digeriert. Die hierauf folgende Scheidung wird durch Zentrifugieren und Filtrieren unter Zusatz von Kieselgur erreicht.

Die Verluste, welche durch diese letztere Operation entstehen, sind verhältnismässig sehr gross; die Lösung zeigt nämlich nunmehr nur 25—40 % der Saccharasewirkung, welche vor der Kaolinbehandlung nachweisbar war und etwa 10—15 % der Saccharasewirkung des ursprünglichen Autolysesaftes.

7. Zweite Dialyse. Durch die nachfolgende Dialyse werden Lösungen vom Zeitwert 0,6—1,0 oder If = 45—75 erhalten.

8. Zweite Tonerde-Sorption. Ist im Verlaufe des angegebenen Verfahrens die Reinigung weniger vollständig ausgefallen, so dass nach der zweiten Dialyse der Zeitwert etwa 1,0 beträgt, so kann das Resultat durch eine zweite Tonerdebehandlung verbessert werden. Man wendet dann geeignet etwa 1 g Tonerde an.

Ausfällung und Darstellung fester Saccharase-Präparate.

Willstätter und Racke fällen ihre eingeengten Enzymlösungen mit Azeton. 40 ccm Lösung wurden unter Umrühren bei 0° mit dem gleichen Volumen von eiskaltem Azeton gefällt, in einer rasch an- und auslaufenden Zentrifuge von der Mutterlauge getrennt und mit eiskaltem Azeton wieder in

der Zentrifuge gewaschen. Diese Behandlung mit Azeton sollte nicht länger als etwa 5 Minuten dauern. Man brachte die bräunliche, krümmelige Füllung rasch in den Exsikkator und evakuierte mit der Hochvakuumpumpe. Die Bestimmungen des getrockneten Präparates, 2,367 g vom Zeitwerte 2,34, ergaben einen weiteren Rückgang der Ausbeute auf 38,6% (M Z.Q. 20,3).

In einigen Beispielen blieb die Ausbeute von der Gewinnung der Elution an bis zum trockenen Präparat konstant, häufiger traten aber, namentlich beim Fällen mit Azeton, Enzymverluste auf, die besonders bei den besten Präparaten die Ausbeute und den Reinheitsgrad erheblich beeinflussten. Dennoch war die Fällung mit Azeton nicht zu entbehren, bei welcher viel von den Begleitstoffen, beispielsweise 3/4 der Menge des Invertinpräparates und noch mehr, in der Mutterlauge zurückblieb. Eine andere Verarbeitung desselben Hefeauszugs ergab 45% Ausbeute in der Elution (bezogen auf die Saccharase nach der Kaolinbehandlung) und lieferte ein Präparat vom Zeitwert 2,8. Eine weitere Autolysenflüssigkeit (13,5 l nach der Kaolinbehandlung) lieferte bei einer Ausbeute von 42% in der Elution 1,4 g Saccharase vom Zeitwert 2,4. In diesem Falle war beim Eindampfen kein Verlust, aber beim Fällen mit Azeton Rückgang auf 26,7% von der Saccharase des Hefeauszugs eingetreten.“

Die gleichen Autoren beschreiben (l. c. S. 101) die Herstellung eines trockenen Präparates vom Zeitwert 0,725.

Wenn bei einem solchen Präparat ein besonders günstiger Reinheitsgrad erzielt wurde, so ging damit geringere Beständigkeit Hand in Hand. 4,4 g Saccharase vom Zeitwert 2,57 (M.Z.Q. 34,2), aufgelöst in 2 l, angesäuert mit 20 ccm 2 n-Essigsäure und filtriert, erlitten eine Einbusse von etwa 6%. Die Adsorption mit 73 g Kaolin war quantitativ, die Elution mit 2 l Wasser unter Anwendung von 40 ccm 0,2 n-Sodalösung enthielt nach dem Filtrieren, Klären und Einengen auf 300 ccm (M.Z.Q. 15,3) 48% der angewandten Saccharase. In der bei zweitägiger Dialyse erhaltenen Saccharaselösung (M.Z.Q. nur noch 11,0), deren Trockenrückstand 0,368 g betrug, besass das Enzym den Zeitwert 0,67, während man ohne die Zersetzung bei der Dialyse 0,5 erreicht hätte. Ein Teil der Ausbeute, 0,227 g (M.Z.Q. 5,23) wurde wieder gelöst und weitere 9 Tage dialysiert, und zwar nun mit sehr geringem Verlust (M.Z.Q. 15,13). Darauf entsprach die Saccharase nach der Wirksamkeit der Lösung und ihrem Trockengewicht (0,142 g) dem Zeitwert 0,55. Bei abermaligem Abdampfen wurde indessen ein Präparat gewonnen, dessen Zeitwert wieder auf 0,85 angestiegen war.

Eigenschaften der best gereinigten Präparate.

Die Lösungen zeigen keine Eiweissreaktionen mehr, „nur eine Art von Xanthoproteinreaktion kommt nie zum Verschwinden“. Die Präparate bleiben beim Erhitzen in 0,3—1%iger Lösung mit Salpetersäure farblos, zeigen aber beim Übersättigen mit Alkali eine rein gelbe, nicht intensive Farbe.

Von Hefegummi sind die durch Kaolinadsorption gereinigten Präparate frei.

Die Saccharase aus Tonerdeadsorbat liefert eine phosphorreiche Asche, enthält Ammoniumsalze und zeigt beim Erhitzen schwache Pyrrolreaktion. Die reinsten Lösungen gaben weder mit Bleiessig noch Bleizucker, Quecksilberchlorid oder Uranylazetat Fällungen (Willstätter, Racke, l. c.).

Soweit sich die Erfahrungen aus dem Stockholmer Laboratorium erstrecken, können die Angaben von Willstätter und Racke durchaus bestätigt werden. Die Untersuchung hochgereinigter Präparate (If = 110 bis 70) durch K. Josephson (Arkiv f. Kemi, Bd. 8, 1922) hat bis jetzt folgendes ergeben:

Aschengehalt: 1—4%.
Phosphorgehalt: 1—2% P.
Hexosen: 60—20%.
Pentosen nach der Orcinreaktion: Unter 5%.
N nach Kjeldahl-Bang: 5—8%.
Amino-N nach van Slyke: $>2\%$ (leicht abspaltbar ca. 1%).

Die früheren Versuche, durch Diffussionsmessungen Anhaltspunkte über die Molekulargrösse bezw. den Dispersitätsgrad der Saccharase zu gewinnen, sind von Gösta Ericson[1]) mit reineren Präparaten (Zeitwerte 0,5—0,8) wiederholt worden. Es konnte ja vermutet werden, dass eine weitergehende Reinigung bezw. Befreiung der Saccharase von anhaftenden hochmolekularen Substanzen gerade die Diffussionsgeschwindigkeit des Enzyms stark beeinflussen würde. Die bis jetzt ermittelten Werte der Molekülgrösse liegen bei 20000. Diese Zahl dürfte das Ergebnis einer weitgehenden Polymerisation der eigentlichen Saccharasemoleküle sein, denen ein viel kleineres Mindestmolekulargewicht (1000—2000) zukommt.

Wirkungs-Bedingungen.

Aziditätsbedingungen. Im I. Teil dieses Buches sind die über die Aziditätsbedingungen der Saccharase ermittelten Tatsachen eingehend besprochen worden, da die Untersuchungen der Saccharase in dieser Hinsicht für das Studium anderer Enzyme vorbildlich gewesen sind.

Es sei hier also zunächst nochmals auf die Kurven von Sörensen und von Michaelis verwiesen (Teil I, Fig. 5 und 6, S. 31 und 32), aus welchen hervorgeht, dass die „optimale Zone" im Aziditätsgebiet pH = 3,5—5,5 liegt.

Es erscheint bemerkenswert, dass nach Versuchen von Myrbäck[2]) mit viel weitergehend gereinigten Präparaten (bis zum Zeitwert 0,6) die gleiche Aziditätskurve erhalten wird, wie z. B. aus folgenden Zahlen hervorgeht, welche sich auf die Lösung K 3 A der zitierten Arbeit beziehen.

---

[1]) Euler und Gösta Ericson Koll. Zs 30; 1922.
[2]) Euler und Myrbäck, H 120, 61; 1922. — Sv. Vet. Akad. Arkiv. f. Kemi Bd. 8, 1922.

Puffer	pH	k · 10⁴	Rel. k
$KH_2PO_4 + H_2SO_4$	3,29	37	92,5
KH_2PO_4	4,37	39,5	99
KH_2PO_4	4,55	40,0	100
$KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$	5,05	38,5	97
$KH_2PO_4 + Na_2HPO_4$	6,51	23,3	58

Diese Unabhängigkeit der Lage des Aziditätsoptimums vom Reinheitsgrad des Enzyms macht es auch wahrscheinlich, dass die diesbezüglichen Verschiedenheiten der Lösungen von Darm- und Hefensaccharase nicht auf den geringeren Reinheitsgrad der ersteren zurückgeführt werden können.

Die Deutung, welche die genannten experimentellen Ergebnisse durch Michaelis erfahren haben, ist ebenfalls im I. Teil dieses Buches, S. 111 bis 123, ausführlich dargestellt worden. Einstweilen hat Michaelis die seinen theoretischen Erörterungen zugrunde liegende Hypothese modifiziert.

Michaelis[1]) hatte die Aktivitätskurve als Dissoziationsrestkurve der Saccharase aufgefasst und den Parameter dieser Kurve als Dissoziationskonstante der Saccharase, $2 \cdot 10^{-7}$, angegeben. Die Annahme steht aber mit einer Reihe von Tatsachen in Widerspruch und Michaelis führt nun als neue, verbesserte Hypothese ein[2]), dass der Parameter der Aktivitätskurve (Geschwindigkeits-pH-Kurve) die Säuredissoziationskonstante der Verbindung Rohrzucker-Saccharase ist. Ob die freie Saccharase auch selbst eine Säure ist, wird bei dieser neuen Auffassung zunächst offen gelassen.

Auch wenn die besonderen Annahmen von Michaelis noch weiterer, eventuell wesentlicher Änderungen bedürfen[3]), so sind doch seine eingehenden Erörterungen über die Anwendungen des Massenwirkungsgesetzes auf die enzymatische Kinetik der Saccharase sehr bemerkenswert und haben zweifellos einen Fortschritt gegenüber den früheren theoretischen Arbeiten in diesem Gebiet gebracht, da die von ihm entwickelten Formeln einer experimentellen Prüfung unterworfen werden können und die Konstanten schon zum Teil zahlenmässig festgestellt sind. Dadurch dürfte sich auch das eingehende Referat im I. Teil rechtfertigen.

Nach Ansicht des Verfassers[4]) bleibt in erster Linie noch zu untersuchen, ob nicht die Berücksichtigung der Salzbildung des Substrats die Beschreibung der Tatsachen und Berechnung der charakteristischen Aktivitäts-pH-Kurve vervollständigt.

Einfluss von Neutralsalzen. Gegen die neutralen Halogenide und Sulfate der Alkalien, alkalischen Erden und seltenen Erden (z. B. Thoriumsulfat) ist Saccharase wenig empfindlich. Dies wird auch durch moderne Versuche von Fales und Nelson[5]) gezeigt, nach welchen sich die Wirkung von NaCl erst in 2-norm. Lösung geltend macht, wenn der pH-Wert optimal ist. Es dürfte sich hier um eine der nichtenzymatischen „Neutralsalzwirkung“

[1]) Michaelis und Menten, Biochem. Zs 49, 333; 1913.

[2]) Michaelis und Rothstein, Biochem. Zs 110, 217; 1920.

[3]) Euler und Svanberg, H. 98, 202; 1917. — (Auf die neueren Arbeiten von Northrop kommen wir bei der Behandlung des Pepsins zurück.)

[4]) Euler und Myrbäck, H. 120; 1922.

[5]) Fales und Nelson, Jl Amer. Chem. Soc. 37, 2769; 1915.

verwandte Erscheinung handeln[1]). Stärker wird diese Salzwirkung ausserhalb des Aziditätsoptimums. Eine weitere Untersuchung der freien Basen $Ca(OH)_2$, $Ba(OH)_2$, $Mg(OH)_2$ und der seltenen Erdbasen bei pH = 6 wäre erwünscht.

Unter älteren Untersuchungen ist noch diejenige von Cole[2]) zu erwähnen; aus neueren Messungen glaubte Neuschlosz[3]) schliessen zu können, dass die Neutralsalze vom Enzym adsorbiert werden und dadurch die Ladung und den Dispersitätsgrad herstellen.

Anorganische Nichtelektrolyte. Wasserstoffsuperoxyd zerstört nur unbedeutend; in höherem Grade inaktiviert Ozon; ein Sauerstoffstrom, enthaltend 0,2 mg O_3, in 5 ccm Enzymlösung eingeleitet, liess aus einer Lösung vom Zeitwert c:a5 in wenigen Minuten 31% der Aktivität verschwinden[4]).

Auch Jod inaktiviert nach Versuchen von S. Landergren[5]) in einer ziemlich weitgehend gereinigten Lösung stark und zwar irreversibel.

Das Jod wurde in verdünnter JK-Lösung zugesetzt. Inkubationszeit 1 Stunde. Zeitwert der Saccharaselösung: 0,86 Min. If = 54.

Zugesetzt mg J_2	0	0,07	0,15	0,74
$k \cdot 10^4$	36	17,7	17,9	16,8

Aus diesen Zahlen und noch deutlicher aus der Figur 24 ersieht man, dass das untersuchte Enzympräparat auffallenderweise nur bis zu einem gewissen Grad vergiftet wird[6]); über diesen hinaus wirken auch ziemlich grosse Jodmengen nicht mehr.

Durch Zusatz von Natriumthiosulfat im Überschuss wird die Jodvergiftung der Saccharaselösungen nicht aufgehoben.

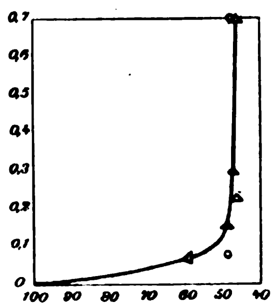


Fig. 24.

Schwermetallsalze. Die Wirkung von Quecksilber-, Silber- und Kupfersalzen ist von Euler und Svanberg[7]) eingehend studiert worden; im I. Teil ist über diese Messungen schon berichtet. Von den Resultaten, welche an Enzymlösungen vom Zeitwert etwa 5 Minuten gewonnen worden sind, seien hier folgende nochmals erwähnt:

1. Die sehr starke Giftwirkung, welche Quecksilber- und Silbersalze auf Saccharase ausüben, ist quantitativ reversibel.

2. $HgCl_2$ wirkte nicht proportional seiner Konzentration (Mitteilung I, Fig. 1).

3. Das Substrat übt auf die Vergiftung durch Schwermetallsalze eine Schutzwirkung aus (Mitteilung I, S. 342).

---

[1]) Siehe hierzu Michaelis, Biochem. Zs 115, 269; 1922.

[2]) Cole, Jl of Physiol. 30, 281; 1904.

[3]) Neuschlosz, Pflüg. Arch. 181, 45; 1920.

[4]) Svanberg, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi Bd. 8, Nr. 6; 1921.

[5]) Euler und Landergren Biochem. Zs 131; 1922.

[6]) Die für obiges Saccharasepräparat gefundene Jodempfindlichkeit stimmt der Grössenordnung nach mit der von U. Olsson für seine Amylasepräparate festgestellten überein.

[7]) Euler und Svanberg, Fermentforschung 1920. I. Mitt. 3, 330. Siehe daselbst ältere Angaben. — III. Mitt. 4, 90. — IV. Mitt. 4, 142.

4. Bei der Metallvergiftung der Saccharase tritt mit der Zeit eine „Selbstregeneration“ des Enzyms ein, welche Analogien zum sog. Danysz-Effekt zeigt.

5. Cu^{++} übt auf Saccharase eine sehr viel schwächere Giftwirkung aus als Hg^{++} und Ag^{+}, während es bekanntlich nach Naegeli ein ausserordentlich starkes Protoplasmagift ist.

Das Hauptziel dieser Untersuchung war, durch Feststellung der Konzentrationsfunktionen der verschiedenen Gifte Anhaltspunkte über die Art und Menge der vergiftbaren Enzymgruppen in Saccharaselösungen von bekannter Wirksamkeit zu gewinnen.

Bei der Metallvergiftung der Saccharase werden Hg^{++} und Ag^{+} durch Komplexbildung entionisiert. Dieser Vorgang wurde bei $AgNO_3$ quantitativ elektrometrisch verfolgt (Mitteilung I, S. 367 und Mitteilung IV, S. 149) und es wurden zahlreiche Substanzen vergleichend elektrometrisch untersucht, um festzustellen, welche von ihnen ein annähernd gleiches Bindungsvermögen für Ag^{+} besitzen. Ein starkes Bindungsvermögen wurde gefunden beim Eier-Albumin von Sörensen, bei Zystein und bei einer Nukleinsäure.

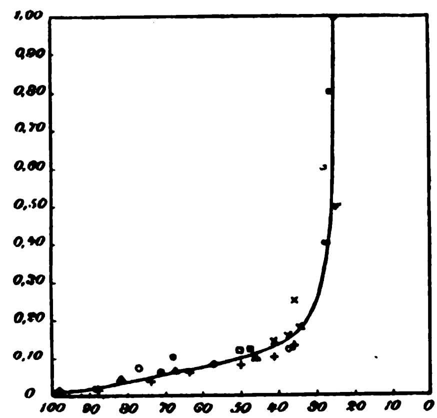


Fig. 25.

Bei einer Ausdehnung dieser Messungen auf andere Enzymkonzentrationen, auch auf bedeutend reinere Saccharaselösungen, ergaben die Messungen von Myrbäck[1]) das auffallende Resultat, dass bei pH = 4,5 mit $AgNO_3$ eine Vergiftungsgrenze erreicht wird.

Als Beispiel sei folgender Versuch angeführt, geltend für optim. pH:

Saccharaselösung K3A, If = 84 (Zeitwert 0,55 Min.). In 60 ccm 8prozentiger Rohrzuckerlösung gibt 1 ccm die Inversionskonstante $49 \cdot 10^{-4}$. In der Figur 25 sind als Ordinaten die zu diesen Lösungen zugesetzten mg $AgNO_3$ angegeben. Die Kurve zeigt, dass auch bei Silberzusätzen, welche über 1 mg steigen, noch 25 % der Saccharasewirkung erhalten bleibt. Auch die Vergiftung durch $AgNO_3$ ist stark von der Azidität der Lösung abhängig.

Bei der Vergiftung mit Quecksilbersalzen machen sich störende Einflüsse mannigfacher Art geltend; auch hier bleibt unter Umständen ein Teil der Enzymwirkung durch Giftüberschuss unverändert.

Organische Hemmungskörper. Bei der Untersuchung des Verf. mit Svanberg[2]) haben sich unter den organischen Saccharasegiften Anilin und p-Toluidin als die wirksamsten erwiesen; auch diese Vergiftungen sind

---

[1]) Euler und Myrbäck, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi Bd. 8, 1922.

[2]) Euler und Svanberg, Fermentforsch. 4, 29; 1920.

(zum Teil) reversibel. Die Konzentrationsfunktion der Anilinvergiftung wurde eingehend festgestellt; man findet die Resultate im I. Teil, S. 152. Mit der Wirksamkeit des Anilins wurden die Wirksamkeiten von 11 anderen Aminen verglichen.

Es wurde festgestellt, dass die Reihenfolge der Giftigkeit der Reihenfolge der Affinität zu Formaldehyd bei der Bildung der Schiffschen Basen entspricht, was besonders bei Anthranilsäure hervortritt.

Später hat Myrbäck ähnliche Messungen an reinerer Saccharase (Zeitwert 0,55) angestellt. Als besonders wirksames Gift erwies sich p-Phenylendiamin; die Vergiftungskurve führt, wie die Figur 26 zeigt, bis zur vollständigen Inaktivierung des Enzyms.

Ohne Wirkung erwies sich Benzylalkohol, welcher von Landergren in Rücksicht auf die Ergebnisse von Macht[1]) und von Jacobson[2]) untersucht wurde.

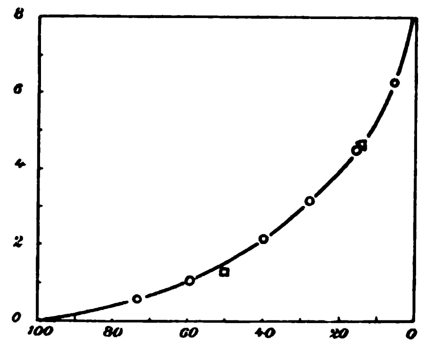


Fig. 26.

Was andere Aldehydreagenzien betrifft, so ist Blausäure wenig schädlich; 8 mg HCN erzeugt in 60 ccm Enzym-Rohrzuckerlösung nur eine Wirksamkeitserniedrigung von 10%. Quantitativ untersucht sind ferner: Hydroxylamin, Hydrazin und Phenylhydrazin. Hervorzuheben ist, dass die Messungen Svanbergs, welche im I. Teil, S. 151 u. ff. referiert sind, für optimale Azidität (pH = 4,5) gelten.

Unter den wirksamen Aminreagenzien ist Formaldehyd zu nennen, welcher zur Vergiftung der Saccharase einer mehrstündigen Inkubationszeit bedarf, sowie Diazoniumsalz.

Was die Alkaloide betrifft, so ist Chininsulfat bei der optimalen Azidität der Saccharase sehr wenig wirksam (Euler und Svanberg)[3]), dagegen wird, wie Rona und Bloch[4]) gezeigt haben, die prozentische Hemmung sehr stark, im alkalischen Gebiet (pH = 7—8). Man kann dies so ausdrücken, dass nur die freie Alkaloidbase inaktiviert, nicht aber das Salz. Aus den Versuchen von Rona und Bloch geht auch hervor, dass die Vergiftung augenblicklich erfolgt und reversibel ist.

Eine langsam verlaufende, vermutlich irreversible Zerstörung des Enzyms tritt mit m- und p-Nitrophenol ein, wie eine interessante Studie von Rona und Bach[5]) ergeben hat.

---

[1]) Macht, Jl of Pharm. 11, 263; 1918.
[2]) Jacobson, Soc. Biol. 83, 255 u. 1054; 1920.
[3]) Euler und Svanberg, Fermentforsch. 4, 29; 1920.
[4]) Rona und Bloch, Biochem. Zs 118, 185; 1921.
[5]) Rona und Bach, Biochem. Zs 118, 232; 1921.

Verhalten zu organischen Lösungsmitteln.

Wir haben hier zwei Tatsachengebiete zu unterscheiden. Einerseits wird die Enzymwirkung durch den Zusatz von organischen, mit Wasser mischbaren Lösungsmitteln verlangsamt, zweitens wird Saccharase in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln mit einer gewissen Geschwindigkeit zerstört.

a) Inversionsgeschwindigkeit in wässerig-alkoholischen Lösungen. Steigert man in Saccharaselösungen unter sonst konstant gehaltenen Konzentrationsbedingungen den Gehalt an Äthylalkohol, so nimmt die enzymatische Inversionsgeschwindigkeit, wie schon O'Sullivan und Tompson[1]) für kleine Alkoholmengen gefunden haben, mit steigendem Alkoholzusatz stark ab. Aus Fig. 27, welche einer Arbeit von Hudson und Paine[2]) entnommen ist, wird der Einfluss über ein grösseres Konzentrations-

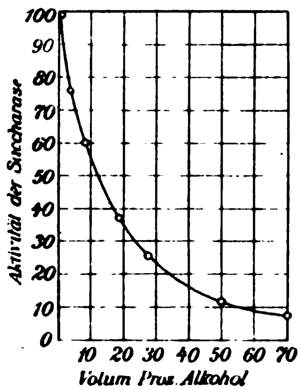


Fig. 27.

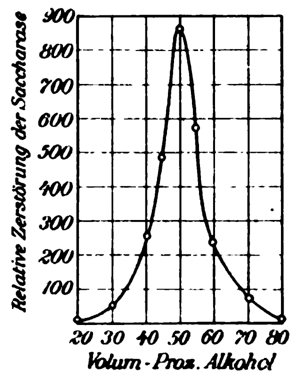


Fig. 28.

gebiet ersichtlich. An diesem Gesamteffekt sind drei Einzelwirkungen des Alkohols beteiligt: 1. eine reversible Änderung der Reaktionsfähigkeit (des Molekularzustandes der Saccharase), 2. eine analoge Änderung des Rohrzuckers, 3. eine irreversible Zerstörung der Saccharase.

Wegen der zweiten der genannten Wirkungen wird auch die nichtenzymatische Inversion durch Zusatz von Alkohol verlangsamt, und was andere Lösungsmittel betrifft, so gilt im grossen und ganzen die Regel, dass die Reaktionsgeschwindigkeit in Lösungsmitteln von hoher Dielektrizitätskonstante am grössten ist.

Auch andere Alkohole, sowie Azeton setzen die enzymatische Inversionsgeschwindigkeit stark herab. So ist z. B. in 70prozentigem Glyzerin die Inversionsgeschwindigkeit sehr gering.

Irreversible Inaktivierung der Saccharase durch Alkohol und Azeton. Die erste eingehende Untersuchung hierüber haben Hudson

[1]) O'Sullivan und Tompson, Jl Chem. Soc. 57, 834 und zwar 860; 1890.

[2]) Hudson und Paine, Jl Amer. Chem. Soc 32, 1350; 1910.

und Paine[1]) ausgeführt, deren Messungen ein sehr scharfes Maximum der Zerstörung der Saccharase bei 50 Volumprozent Alkohol ergeben haben (s. Fig. 28).

Die Figur zeigt, dass Alkohol unter 20 % und über 80 % nicht mehr zerstörend wirkt. Der Umstand, dass hochprozentiger Alkohol wenig schadet, hängt wohl mit seiner fällenden Wirkung zusammen. Rohrzucker übt nach den amerikanischen Forschern eine sehr bedeutende Schutzwirkung aus.

Willstätter und Racke fanden, dass Azeton die Saccharase in ähnlicher Weise hemmt und zerstört wie Äthylalkohol (l. c. S. 104). Sie fanden ferner die Zerstörung in hohem Masse vom Reinheitsgrad der Saccharase abhängig.

Kinetik.

Kein anderes Enzym ist hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs seiner Wirkung und hinsichtlich der Konzentrationsfunktionen so eingehend untersucht worden wie die Saccharase. Da ausserdem bei diesem Enzym die Verhältnisse in mancher Hinsicht ziemlich einfach liegen — das Substrat ist leicht rein darstellbar, der chemische Vorgang ist einfach, Co-Enzyme scheinen nicht mitzuwirken —, so ist die Rohrzuckerinversion durch Saccharase im allgemeinen Teil dieses Buches (S. 105—123) als Beispiel für enzymatische Reaktionen überhaupt ausführlich behandelt worden.

Auch was die theoretische Deutung des vorliegenden Zahlenmaterials betrifft, kann auf das im 1. Teil Gesagte verwiesen werden.

Bezüglich der von Michaelis gegebenen Deutung der pH-Aktivitätskurve muss auch an dieser Stelle auf die von ihm eingeführte Modifikation[2]) seiner früheren Vorstellung verwiesen werden, nach welcher sich die genannte Kurve auf die Verbindung Saccharase-Rohrzucker bezieht.

Ergänzend mag erwähnt werden, dass natürlich noch andere Deutungen der Aziditätskurve als die von Michaelis gegebene möglich sind. Geht man von der gut begründeten Annahme aus, dass die Reaktionsgeschwindigkeit proportional ist der Konzentration Enzym-Substrat, so wird man bei wechselnder Azidität ein Aktivitäts-Maximum bei derjenigen Azidität zu erwarten haben, bei welcher die Konzentration der Molekülart Saccharase-Rohrzucker ihr Maximum erreicht. Eine solche Aziditätsfunktion würde sich auch dann herleiten lassen, wenn man von der Säurenatur der Saccharase ganz absieht. Wir brauchen nur anzunehmen, dass die eine der beiden Komponenten eine innere Umlagerung erfährt und dass die Form, welche sich mit der anderen Komponente vereinigt, ihre maximale Konzentration bei der Azidität pH = 4—5 besitzt[3]).

Über den Einfluss der Zuckerkonzentration siehe Brown (Jl Chem. Soc. 1902) und Myrbäck (1922).

Eine Reversion, also eine enzymatische Synthese des Rohrzuckers, dürfte bis jetzt noch nicht einwandfrei durchgeführt worden sein. Immerhin verdienen die von Pantanelli[4]) angegebenen Versuche eine Wiederholung und Erweiterung. Siehe hierzu I. Teil, S. 225.

[1]) Hudson und Paine, Jl Amer. Chem. Soc. 32, 1350; 1910.
[2]) Michaelis und Rothstein, Biochem. Zs 110, 217; 1920.
[3]) Euler und Myrbäck, H. 120; 1922.
[4]) Pantanelli, Bot. Ber. 26a, 494; 1908.

Einfluss der Temperatur.

Stabilität der Saccharase.

Den eingehenden Erörterungen des ersten Teiles, S. 174 können wir zunächst folgende Tatsachen entnehmen:

Die Stabilität des Enzyms wird ausgedrückt durch einen Reaktionskoeffizienten erster Ordnung, k_c. Da dieser Koeffizient um so grösser ist, je schneller die Inaktivierung verläuft, so wird er als Inaktivierungskoeffizient bezeichnet. Er ist nicht unabhängig von der Verdünnung des Enzyms und von der Erhitzungszeit; deswegen sind zur Bestimmung des Inaktivierungkoeffizienten bzw. der Inaktivierungskonstanten[1]) folgende Bedingungen vorgeschlagen worden:

Erhitzungszeit 50—70 Minuten, Interpolation auf 60 Minuten. Die Enzymkonzentration ist so zu wählen, dass bei Zimmertemperatur die Inversionskonstante unter Normalbedingungen den Wert $40 \cdot 10^{-4}$ erreicht.

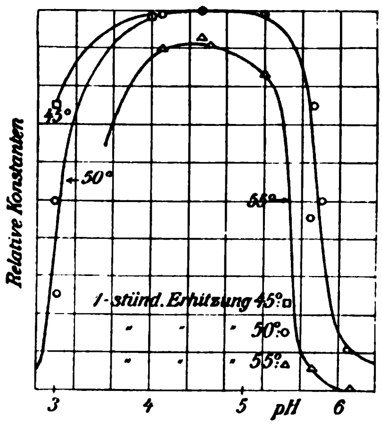


Fig. 29.

Die Stabilität der Saccharase ist in erster Linie von der Azidität und von der Temperatur und schliesslich von der Gegenwart von Schutzstoffen und Adsorbentien abhängig.

Betrachten wir zunächst Schutzstoff-freie Lösungen, so gelten für den Einfluss der Azidität die von Laurin[2]) gegebenen Kurven (Fig. 29). Sie zeigen ein ausgeprägtes Optimum im Aziditätsgebiet pH = 4—5.

Beträchtliche Schutzwirkungen üben der Rohrzucker bzw. dessen Spaltprodukte aus: Hinsichtlich der Fruktose lagen schon einige ältere Versuche von Hudson und Paine[3]) vor. Mit neuerer Methodik hat Laurin die Wirkung eines Zusatzes von 4% Rohrzucker bei 60° untersucht und gefunden, dass schon durch diesen verhältnismässig geringen Zusatz eine Schutzwirkung von etwa 40% der gesamten Inaktivierung erreicht wird. Vermutlich ist die Schutzwirkung des Rohrzuckers bzw. der Spaltprodukte auf der sauren Seite geringer als auf der alkalischen. Verhältnismässig unbedeutend ist die Schutzwirkung von Eiweissstoffen.

Die Inaktivierungsgeschwindigkeit, also auch der Wert von k_c, wächst sehr stark mit der Temperatur (vergl. I. Teil, S. 185) wie folgende Zahlen zeigen, welche für die Stabilität der Oberhefensaccharase in reiner wässeriger (nur Puffer enthaltenden) Lösung und für optimale Azidität gelten:

Temperatur	58	60	62	64
$k_c \cdot 10^3$	3	8	20	45

---

[1]) Ihr inverser Wert, $1/k_c$ wird Stabilitätskonstante genannt.

[2]) Euler und Laurin, H. 108, 64; 1919 und 110, 55; 1920.

[3]) Hudson und Paine, Jl. Amer. Chem. Soc. 32, 985 und zwar 988; 1910.

Berechnet man die Temperaturkonstante A aus den experimentell ermittelten Inaktivierungskoeffizienten k_c nach der Formel

$$k_{c_2} = k_{c_1} \cdot e^{\frac{A (T_2 - T_1)}{2 T_2 T_1}},$$

so ergibt sich A zu 101 000. Diese Temperaturkonstante A ändert sich, wie Figur und Tabelle auf Seite 185 des I. Teiles ausweisen, nicht unerheblich mit der Azidität.

Vergleichen wir die Inaktivierungskonstante der Saccharase für eine gewisse Temperatur, etwa für 60°, mit derjenigen anderer Enzyme, so finden wir, dass die Saccharase bezüglich ihrer Temperaturempfindlichkeit eine Mittelstellung einnimmt.

Malz-Amylase	38	Saccharase	5—8
β-Glukosidase	13	Pepsin (c : a)	3,6
		Trypsin	0,6

Viel empfindlicher sind Lab und Katalase, viel stabiler sind Urease und Papain.

Dabei ist allerdings zu betonen, dass noch keines dieser Enzyme in reinem Zustande untersucht worden ist, und dass möglicherweise die reinen Enzyme sich labiler oder stabiler erweisen werden. Von einem gewissen Grad der Verunreinigung an ist der Einfluss auf die Grösse von k_c nicht mehr erheblich, wie Verfasser mit Laurin an Saccharase festgestellt hat. Die zu diesen Messungen verwendeten Enzymlösungen hatten aber im Mittel die Aktivität If = 7,5. Ganz neuerdings haben Verfasser und Myrbäck[1]) diese Messungen mit einer wesentlich reineren Lösung wiederholt, deren Inversionsfähigkeit If = 39—84 betrug (Zeitwert = 1,2 – 0,55), und in welcher die Saccharase vom Hefengummi weitgehend befreit war. Die folgende Figur 30 zeigt das Ergebnis der neuen Versuchsreihe neben den früheren Laurin'schen Werten.

Die Temperaturempfindlichkeit erwies sich nicht immer grösser als die des weniger gereinigten Enzyms, vielmehr war die Temperaturempfindlichkeit des Präparates vom Zeitwert 0,55 wesentlich geringer, entsprechend einem Temperaturunterschied von etwa 2°. Ähnliche Differenzen hat Laurin zwischen Saccharase aus Oberhefe und aus Unterhefe gefunden. Andererseits ist die Möglichkeit zu erwägen, dass letzterer Unterschied auf Ungleichheiten hinsichtlich gebundener Stoffe zurückzuführen ist, welche nicht eigentlich zum Saccharasemolekül gehören. Schliesslich muss auch betont werden, dass das Gesagte bezüglich der Temperaturempfindlichkeit bei optimaler Azidität gilt, während die Empfindlichkeit auf der sauren oder alkalischen Seite weit grössere Divergenzen aufweisen könnte.

[1]) Euler und Myrbäck, H. 119; 1922.

Einfluss der Temperatur auf die Inversionsgeschwindigkeit.

Bereits im ersten Teil ist in der Tabelle S. 193 gezeigt worden, dass der Temperaturkoeffizient der Saccharasewirkung demjenigen der meisten anderen Enzymreaktionen entspricht, indem sich zwischen 20° und 30° die Geschwindigkeit bei einer Temperatursteigerung von 10° verdoppelt; $k_{30} : k_{20} = 2$. Der Temperaturkoeffizient A der Arrhenius'schen Temperatur-

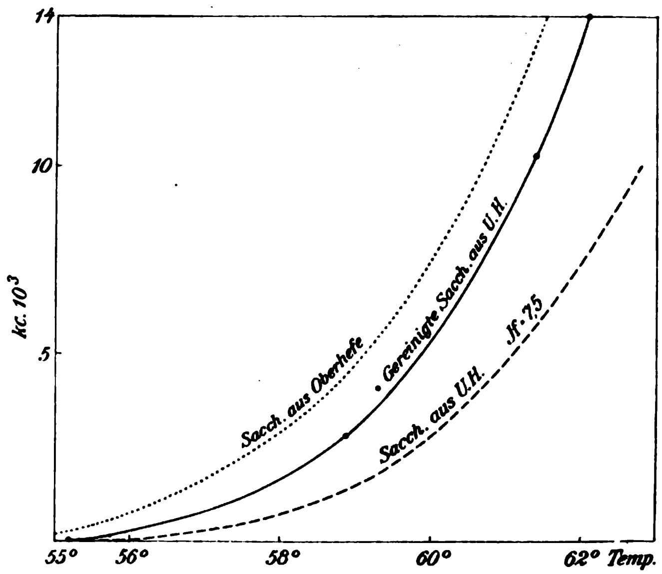


Fig. 30.

formel nimmt mit steigender Temperatur nicht unerheblich ab. Nach neueren Messungen von Laurin[1]) lässt sich A durch eine Interpolationsformel

$$A = 11400\ (1 - 0{,}009\ t)$$

zwischen 0° und 50° gut darstellen. Mit dieser Formel stehen auch die früher von Kjeldahl und von O'Sullivan und Tompson gewonnenen Resultate gut im Einklang.

Bemerkenswert ist, dass der Temperaturkoeffizient der nicht enzymatischen Säurekatalyse des Rohrzuckers erheblich grösser ist als derjenige der enzymatischen Inversion. Für die Temperatur von 20° ist nämlich bei der Reaktion

Rohrzucker-Salzsäure	Rohrzucker-Saccharase
A = 25600	9400.

Die Temperaturabhängigkeit der Saccharase setzt sich aus verschiedenen Temperatureinflüssen zusammen, welche in der Arbeit von Euler und Laurin (1920) näher besprochen sind. Aus den dortselbst mitgeteilten

[1]) Euler und Laurin, H. 110, 55; 1920.

Messungen scheint hervorzugehen, dass die Gleichgewichtskonstante zwischen Saccharase und Rohrzucker, welche ja die Konzentration der reagierenden Molekülart bestimmt und damit auf die Reaktionsgeschwindigkeit einen wesentlichen Einfluss besitzt, sich mit der Temperatur nicht wesentlich ändert. Natürlich ist zu berücksichtigen, dass die Reaktionsfähigkeit des Rohrzuckers selbst mit der Temperatur wächst, und auch die elektrolytischen Dissoziationsgleichgewichte von Enzym und Substrat von der Temperatur beeinflusst werden können.

Einfluss der Strahlung.

(Vergleiche I. Teil S. 197 ff.)

Wie Downes und Blunt, Fernbach[1]), Emmerling[2]) sowie Jamada und Jodlbauer[3]) fanden, wird Saccharase von den Strahlen des Sonnenlichts in sauerstofffreier Atmosphäre nur wenig geschädigt, erst die Gegenwart von Sauerstoff bedingt eine erheblichere Lichtdestruktion.

Durch Zusatz gewisser Gruppen von fluoreszierenden Stoffen kann die Lichtempfindlichkeit der Saccharase erhöht werden, und zwar sind auf Saccharase als Sensibilisatoren Stoffe aus der Fluorescein-, Anthrazen-, Thiazin- und Chinolingruppe wirksam[4]).

Ultraviolette Strahlen wirken nach Jodlbauer und v. Tappeiner[5]) dagegen unabhängig von der Gegenwart von Sauerstoff. Agulhon[6]) sucht die Lichtzerstörung durch die Bildung von Wasserstoffsuperoxyd und dessen Einwirkung auf die Saccharase zu erklären. Zur Aufklärung dieser Frage wurde eine gereinigte Lösung von Saccharase, If = 8,6, aus dem hiesigen Laboratorium verwendet. Svanberg[7]), der diese Versuche in Quarzgefässen mit einer Quecksilberlampe ausgeführt hat, fand Lösungen von geringerem Trockensubstanzgehalt erheblich empfindlicher als weniger reine Lösungen. Die Lichtwirkung konnte durch Einleiten von Wasserstoff verhindert werden, was darauf hindeutet, dass es sich hier grösstenteils um einen sekundären photochemischen Effekt handelt. Die Vermutung Agulhons, dass die Lichtdestruktion auf die Bildung von Wasserstoffsuperoxyd zurückzuführen ist, trifft indessen nicht zu; Saccharase ist gegen dieses Oxydationsmittel sehr unempfindlich. Viel grösser ist ihre Empfindlichkeit gegen Ozon, aber auch diese Wirkung ist für die quantitative Erklärung des Lichteffektes nicht ausreichend.

---

[1]) Fernbach, Ann. Pasteur, 3, 483; 1889.
[2]) Emmerling, Chem. Ber. 34, 3811; 1901.
[3]) Jamada und Jodlbauer, Biochem. Zs 8, 62; 1908.
[4]) Jodlbauer und v. Tappeiner, Arch. f. klin. Med. 82, 520; 1905.
[5]) Jodlbauer und v. Tappeiner, Arch. f. klin. Med. 87, 373; 1906.
[6]) Agulhon, Ann. Pasteur, 26, 38; 1912.
[7]) Svanberg, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, Bd. 8, Nr. 6; 1921.

Anreicherung lebender Zellen an Saccharase.

Saccharase der Hefen.

Die ersten Versuche wurden von Wortmann 1882 und von Fernbach 1890 angestellt; die Untersuchung des letzteren Forschers muss, wie schon früher betont wurde, als eine für die damalige Zeit bedeutende Leistung bezeichnet werden, wenn auch die angewandten Methoden und die Berechnung der Messungen nicht mehr dem jetzigen Stand der Enzymforschung entsprechen. Von teilweise anderen Gesichtspunkten aus und mit modernen Hilfsmitteln hat Verf. mit einer Reihe von Mitarbeitern den Einfluss der Nährlösung und die Bedingungen der Temperatur und der Azidität studiert, unter welchen eine Hefe ihr Maximum an Saccharasegehalt erreicht[1]). Im ersten Teil dieses Buches (S. 284 ff.) ist schon ziemlich ausführlich darüber berichtet worden, so dass hier nur mehr unter Hinweis auf die Originalarbeiten die wesentlichsten Punkte erwähnt zu werden brauchen.

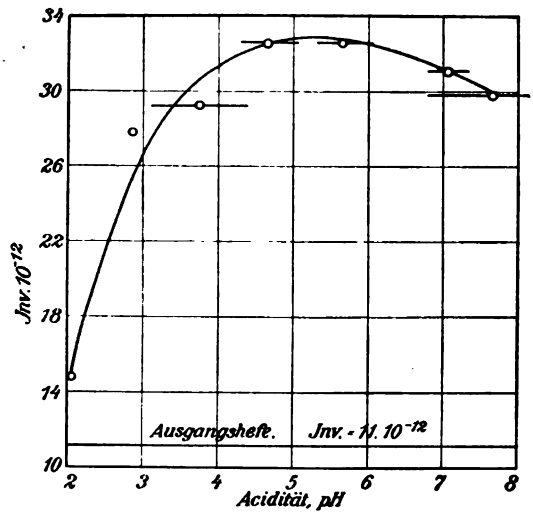


Fig. 31.

Die Vermehrung der Saccharase findet im allgemeinen in Lösungen statt, welche neben geeigneter Stickstoffnahrung (besonders Aminosäuren, Peptiden und Peptonen) einen gärfähigen Zucker enthalten. Letzterer kann durch andere Kohlenstoffnahrung nicht ersetzt werden. Der Verlauf der Enzymbildung ist dann ziemlich regelmässig, eine Verdoppelung tritt im allgemeinen in 12—20 Stunden ein, und die Anreicherung kann mehrmals wiederholt werden, so dass der Enzymgehalt schliesslich bis auf den 7 fachen ursprünglichen Betrag der Hefe gesteigert werden konnte.

Was den Temperatureinfluss[2]) betrifft, so ist ein gewisser Zusammenhang zwischen Enzymbildung und Zellenzuwachs wahrscheinlich geworden. Bei der daraufhin untersuchten Unterhefe H lag das Optimum der Saccharasebildung bei 27,5°, das Optimum des Zellenzuwachses bei 23,5°.

Die gleiche Unterhefe zeigte (Fig. 31) ein ausgesprochenes Aziditäts-Maximum der Saccharasebildung[2]) bei pH = 5—6. Dabei ist zu bemerken, dass sich die Hefe einerseits bis zu einem gewissen Grade der Azidität der Lösung

[1]) Euler u. af Ugglas, Sv Vet. Akad. Ark. f. Kemi, Bd. 3, Nr. 34; 1910. — Euler u. Johansson, H. 76 u. 84. — Euler u. Meyer, H. 79. — Euler u. Cramér, H. 88 u. 89. — Euler, Biochem. Zs. 85, 406; 1918. — Euler u. Svanberg, H. 106, 201; 1919.

[2]) Euler u. Svanberg, H. 106, 201; 1919.

anpasst (Euler u. Emberg 1918), andererseits selbst eine gewisse, allerdings über ihrem Aziditätsoptimum liegende Azidität in der Nährlösung einstellt.

Auch der Rückgang der Anpassung an die Temperatur ist durch einige orientierende Versuche untersucht worden.

Saccharasebildung in abgetöteter Hefe.

Bei der beschleunigten Autolyse fanden Willstätter und Racke öfters in den Auszügen mehr Saccharasewirkung als in den angewandten Hefen. Unter 27 Hefeproben wurde in 14 Fällen Zuwachs an Inversionsvermögen gefunden. „Die Zunahme an Invertinwirkung ist entweder durch die Beseitigung oder Abschwächung eines Hemmungskörpers oder durch die postmortale Bildung des Enzyms aus einer inaktiven Vorstufe, einem Zymogen, zu erklären. Die Annahme, dass beim Abtrennen der Autolysenflüssigkeit mit den Hefenrückständen ein Hemmungskörper beseitigt wird, verliert an Wahrscheinlichkeit durch Versuche, in denen ohne Abtrennung eines Extraktes Zunahme an invertierender Wirkung festgestellt wurde."

Beim Zerreiben der frischen Hefe pflegte eine derartige Vermehrung der enzymatischen Wirksamkeit nicht einzutreten, denn die Bestimmungen mit zerriebener Hefe waren gute Bestätigungen der Saccharasebestimmung in frischer Hefe. Als aber einmal eine besonders Saccharase-arme Hefe mit der 2—3 fachen Menge Seesand kräftig zerrieben und mit Wasser eine halbe Stunde geschüttelt wurde, lieferte sie $119 \pm 4\,\%$ der ursprünglichen Saccharase. Willstätter und Racke ziehen also den Schluss, dass die Hefezelle zwar oft nur fertige Saccharase enthält, zuweilen aber neben der fertigen in untergeordnetem Masse auch eine Vorstufe derselben.

Übrige Saccharasen.

Unter den Mucorarten ist nach E. Chr. Hansen[1]) nur Mucor racemosus imstande, Rohrzucker zu invertieren. Neuerdings haben nun S. Kostytschew und Eliasberg[2]) die interessante Beobachtung beschrieben, dass nur „Mucor racemosus —" Saccharase enthält, während „Mucor racemosus +" gar keine Inversion des Rohrzuckers bewirkt. Wie die Autoren betonen, ist es beachtenswert, dass zwei Pilzrassen, „die morphologisch absolut nicht zu unterscheiden sind, ganz prägnante physiologische Unterschiede zeigen."

Saccharase der Aspergillaceen.

Schon lange weiss man, dass sich die Saccharase in Aspergillaceen findet[3]), besonders durch Arbeiten von Bourquelot[4]), Fernbach[5]), Duc-

[1]) E. Chr. Hansen, Medd. Carlsb. Lab. 2, 143; 1888.
[2]) S. Kostytschew und Eliasberg, H. 118, 233; 1922.
[3]) Zuerst beobachtet von Béchamp, C. r. 46, 44; 1858.
[4]) Bourquelot, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 16, 578.
[5]) Fernbach, Ann. Inst. Pasteur, 4, 1; 1890.

laux, Went, Effront. Quantitative Versuche haben später ergeben[1]), dass die Inversionsfähigkeit per g Zellensubstanz bei den untersuchten Schimmelpilzen bedeutend kleiner ist, als bei den Kulturhefen. Es wurden nämlich folgende relativen Werte für If gefunden:

Unterhefe	100	Penicillium glaucum	10
Oberhefe	60	Aspergillus niger	2.

Hinsichtlich der Aziditäts- und Temperatur-Einflüsse scheint die Saccharase der Schimmelpilze sich von der Hefensaccharase wenig zu unterscheiden.

Kosmann[2]) hat Saccharase auch in anderen niederen Pilzen nachgewiesen. In Fusarien findet sich Saccharase nach Wasserzug[3]) und ist in verschiedenen Fusariumarten von Hawkins[4]) näher studiert worden.

Bakterien-Saccharase.

Wegen des Nachweises in verschiedenen Bakterienarten sei auf die Zusammenstellungen von Fuhrmann[5]) und von Kruse[6]), besonders auch auf die Arbeiten von Fermi und Montesano[7]) verwiesen. Bemerkenswert ist der Befund von Avery und Glenn E. Cullen[8]), dass das Aziditäts-Optimum der Pneumokokken bei etwa pH = 7 liegt. Es ist zu vermuten, dass dies für die Saccharasen vieler anderer Bakterien gilt, welche sich ebenfalls bei dieser Azidität oder in ganz schwach alkalischer Lösung am besten entwickeln.

B. Delbrück enthält Saccharase (Cramér), Milchsäure-Streptococcus Sbg. nicht (Fermentf. 2, 194).

Saccharase der Leukozyten.

In einer interessanten Arbeit hat es kürzlich Boissevain[9]) wahrscheinlich gemacht, dass in den Leukozyten des normalen tierischen Blutes Saccharase enthalten ist. Rohrzucker scheint eine Schutzwirkung auf diese Saccharase auszuüben. Die Tatsache, dass nach Injektion von Rohrzucker ins Blut die invertierende Wirkung desselben steigt, deutet Boissevain damit, dass die aus den Leukozyten austretende Saccharase durch den Rohrzucker gebunden und dadurch vor schneller Zerstörung bewahrt wird.

Als Aziditätsoptimum für die Leukozyten-Saccharase gilt pH = 7,9.

---

[1]) Euler und Asarnoj, Fermentforsch. 3, 318; 1919. Euler und Borgenstam, Fermentforsch. 4, 242; 1921.

[2]) Kosmann, Bull. Soc. Chem. 27, 251; 1877.

[3]) Wasserzug, Ann. Inst. Pasteur, 1, 525; 1886.

[4]) Hawkins, Jl Agr. Research 6, 1916. Ref. Zbl. f. Biochemie 21, 404; 1920.

[5]) Fuhrmann, Bakterienenzyme. Fischer, Jena 1907.

[6]) Kruse, Allgemeine Mikrobiologie, Leipzig 1910.

[7]) Fermi und Montesano, Zbl. Bakt. (2) 1, 482, 542; 1895. Fermi, Zbl. Bakt. 12, 713.

[8]) Avery und Glenn Cullen, Jl of exp. med. 32, 583; 1920.

[9]) Boissevain, Ned. Tijdschr. Geneesk. 1, 226; 1918 u. Arch. Néerl. Physiol. II, 3, 415.

Saccharase als „Abwehrferment" nach Abderhalden.

Ein typischer Versuch, auf welchen Abderhalden seine Behauptung stützt[1]), dass nach intravenöser Injektion von Rohrzucker bei höheren Tieren Saccharase als Abwehrferment gebildet wird, ist im I. Teil, S. 272 angegeben worden. Es würde zu weit führen, hier auf die sehr interessante aber noch ungeklärte Frage einzugehen, ob, resp. wann Rohrzucker als Abwehrferment auftritt[2]). Wird nach Einführung von Rohrzucker ins Blut der Saccharasegehalt der Leukozyten oder Organzellen vermehrt, so ist diese Enzymbildung vielleicht wesensgleich mit der in Hefezellen genauer studierten.

C. Methoden zur Messung der Spaltung der Hexoside. Definitionen und Einheiten der Enzymwirkungen.

In erster Linie kommt hier die polarimetrische Methode in Betracht. Besonders zur Verfolgung der Inversion des Rohrzuckers ist sie wegen der grossen Drehungsänderung sehr genau und auch bisher zu dem vorliegenden Zweck fast ausschliesslich angewandt worden.

Wenn die Beobachtung der Drehung wegen Trübheit der Lösung schwer oder unmöglich ist, so kann man den Fortschritt der Reaktion durch das Reduktionsvermögen der Lösung — etwa nach der Methode von Bertrand — messen. Aus dem nicht reduzierenden Rohrzucker entstehen zwei reduzierende Hexosen, auch bei der Maltosespaltung steigt das Reduktionsvermögen der Lösungen. Immerhin wird man letztere Methodik nur in Ausnahmefällen verwenden.

Rohrzuckerinversion.

Wesentlich ist, dass man, wie schon O'Sullivan und Tompson getan haben, die Inversion bei geeigneter Azidität, am besten bei optimaler Azidität verlaufen lässt. Man sorgt dafür durch Zusatz eines Puffers zur Lösung, wozu gewöhnlich Phosphat verwendet wird, obwohl natürlich auch andere Puffer brauchbar sind (vgl. Teil I, S. 43). Die optimale Azidität liegt für Hefensaccharasen im pH-Gebiet 3,5 bis 5, während die tierischen Saccharasen in neutraler Lösung, um pH = 6, am besten zu wirken scheinen.

Bezüglich der Wahl der Temperatur ist man, wenn die Azidität optimal ist, bis zu etwa 45° hinauf nicht beschränkt, bei noch höheren Wärmegraden ist Vorsicht geboten, von 55° an lässt sich eine Zerstörung des Hefen-Enzyms nicht vermeiden. In der Regel wird man die Inversion zwischen 15 und 25° verlaufen lassen.

---

[1]) Die ersten Angaben über das Auftreten einer Saccharase nach subkutaner Injektion im Blut junger Hunde verdankt man Weinland (Zs f. Biol. 47, 279; 1906).

[2]) Siehe hierzu auch Herzfeld u. Klinger, Biochem. Zs 114, 27; 1921. — Abderhalden, ebenda 117, 161; 1921. — Knaffl-Lenz, H. 120, 110; 1922.

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist von der Konzentration des Rohrzuckers abhängig und diese muss also in Rechnung gezogen werden, sofern man nicht zur Prüfung der Wirksamkeit einer Lösung gewissen Vorschriften folgt, was zu empfehlen ist.

Bei der enzymatischen Inversion des Rohrzuckers entsteht primär α-Glukose, welche sich aber in Lösung bald mit β-Glukose ins Gleichgewicht setzt. Durch die Nichtbeachtung dieses Umstandes, der schon O'Sullivan und Tompson bekannt war, und auf den später Hudson[1]) wieder nachdrücklich aufmerksam gemacht hat, haben mehrere kinetische Untersuchungen ihren Wert verloren. Die Umlagerung der α-Glukose verläuft übrigens schon bei geringem Überschuss von Hydroxylionen, also etwa in 0,001 n. NaOH-Lösung bei Zimmertemperatur in wenigen Minuten vollständig. Man hebt die „Mutarotation" der Glukose am besten mit Sodalösung auf.

Für die Berechnung der Inversionskonstanten k kann man die Enddrehung entweder experimentell bestimmen oder aus der Anfangsdrehung berechnen. Die maximale Linksdrehung (Enddrehung), L max., ergibt sich nach der Formel:

$$L\ max. = R\ max.\ (0{,}44 - 0{,}005\ t).$$

Zur Messung und Angabe der Wirksamkeit kann man in zweierlei Weise verfahren.

1. Man bestimmt die Zeit, welche unter gewissen Wirkungsbedingungen vergeht, bis die Drehung der enzymhaltigen Rohrzuckerlösung auf 0° gesunken ist. Diese Art der Wirkungsbestimmung, welche den Vorzug grosser Einfachheit besitzt, stammt von O'Sullivan und Tompson (l. c.), ist später im Stockholmer Laboratorium oft verwendet worden und bildet die Methode, nach welcher Willstätter seine Präparate misst.

0,05 g getrocknete Hefe (oder der dieser Menge entsprechende Auszug) oder 0,05 g Enzympräparat werden in 5 ccm 0,5 n. NaH_2PO_4-Lösung aufgeschlemmt bzw. gelöst und dann zu 20 ccm 20 prozentiger Rohrzuckerlösung gegeben. Man misst die Zeit, welche verfliesst, bis bei gegebener Temperatur (15°—20°, Temperaturkoeffizient siehe S. 194) nach Aufhebung der Mutarotation durch Soda die Drehung bei gelbem Licht 0° beträgt.

Man schreibt:

$$\pm 0^{\circ} = t\ \text{Minuten},$$

und bezeichnet die so ermittelte Anzahl Minuten als Zeitwert.

Dieser Zeitwert ist offenbar ein Mass für die Saccharasemenge in der Lösung bzw. für den Reinheitsgrad des eingewogenen Präparates.

Man kann natürlich auch, statt feste Saccharasepräparate einzuwägen, aus dem Trockengewicht von Saccharaselösungen den Zeitwert bestimmen.

---

[1]) Hudson, Jl Amer. Chem. Soc. 30, 1160; 1564; 1908.

Die Drehung 0° entspricht für die D-Linie einer Spaltung von 75,75% der Totalreaktion. Willstätter und Racke (l. c. S. 8) bringen die pufferhaltige Zuckerlösung mit etwa so viel Saccharaselösung auf 100 ccm, dass die Hydrolyse zur Nulldrehung 60—180 Minuten erfordert. Zwischen 50 und 75% Spaltung wird die Reaktion durch Eintragen von 25 ccm in 5 ccm 2-n. Soda gehemmt.

Für die Extrakte bezieht Willstätter die Zeitwerte auf die verarbeiteten Hefen (Saccharase aus 0,05 g wasserfreier Hefe), so dass sie ein Mass der Ausbeute darstellen (Zeitwert bezogen auf Hefe);

$$\frac{\text{Zeitwert der Hefe}}{\text{Zeitwert d. Extr. b. a. H.}} \cdot 100 = \text{Ausbeute.}$$

Um auch die Enzymmengen (und bei den Präparaten die Ausbeute) zu bestimmen und zu vergleichen führt Willstätter zwei Ausdrücke ein:

Menge-Zeit-Produkt und Menge-Zeit-Quotient.

Ersteres ist die Zeit, die zur Inversion des Rohrzuckers bis auf 75,75% erforderlich wäre, wenn die gesamte Enzymmenge unter den angegebenen Bedingungen auf 4 g Rohrzucker in 25 ccm einwirken würde.

Der Menge-Zeit-Quotient (M.Z.Q.) ist der reziproke Wert, ist Enzymmenge in einer konstanten willkürlich gewählten Gewichtseinheit ausgedrückt, nämlich der Quotient des in Form von Hefe, Extrakt oder Präparat gewogenen (bzw. abgemessenen) Materials und seiner durch den Minutenwert gemessenen Wirkungszeit. Dieser Wert, der Enzymmenge direkt proportional, ist additiv; den Summen verschiedener Saccharasemengen entsprechen die Summen ihrer Menge-Zeit-Quotienten.

2. Verf. zieht es zu genaueren Bestimmungen vor, die katalytische Wirkung eines Präparates oder einer Lösung durch die Inversionskonstante[1]) auszudrücken, welche in einer Rohrzuckerlösung von bekannter Zusammensetzung erreicht wird. Die Inversionskonstante k wird berechnet nach der Gleichung

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{R + L}{\alpha + L}$$

wo R die Anfangsdrehung, L die Enddrehung und α die Drehung zur Zeit t bezeichnet.

In der Regel wird mit dekadischen Logarithmen gerechnet und die Zeit in Minuten ausgedrückt.

Die Inversionskonstante k, dividiert durch die Konzentration des Enzympräparates (%) ergibt die Aktivitätszahl k/%.

Zeitwert t und Reaktionskonstante k sind (bei gleicher Temperatur) durch die Gleichung verbunden:

$$k \cdot t = 0{,}6153.$$

[1]) Trotz des leichten Ansteigens der Konstanten bei optimaler Azidität stellen die Mittelwerte dieser Konstanten ein hinreichend genaues Mass der Aktivität dar, und bieten etwas grössere Sicherheit, als wenn nur eine einzige Zeitmessung ausgeführt würde.

Inversionsfähigkeit.

Euler und Svanberg[1]) haben für die Inversionsfähigkeit eines Präparates oder Saftes die Beziehungen aufgestellt:

$$If = \frac{k \cdot g\,Zucker}{g\,Trockensubstanz} \text{ bzw. } \frac{k \cdot g\,Zucker}{g\,Präparat}.$$

Aus der Aktivitätszahl k/% wird If erhalten durch Multiplikation mit

$$\frac{0{,}08}{\text{Trockensubstanz-Prozent der Enzymlösung}}.$$

Aus dem O'Sullivan-Tompsonschen Zeitwert $\pm\ 0^0 = t$ Minuten (berechnet für 4 g Rohrzucker und 0,05 g Präparat), ergibt sich If für 18° durch die Gleichung[2])

$$If = \frac{46.176}{t}.$$

Bestimmung der Saccharase in den Hefezellen.

Es ist zur Charakterisierung der verschiedenen Hefen wesentlich, den Enzymgehalt, hier den Saccharasegehalt der Zellen quantitativ bestimmen zu können. In dieser Hinsicht sind folgende Tatsachen hervorzuheben:

Suspendiert man frische Hefezellen in Rohrzuckerlösungen, so tritt während der Inversion die Saccharase nicht in die Rohrzuckerlösung über, wie durch Abzentrifugieren der Hefe während der Reaktion gezeigt werden kann[3]). Arbeitet man mit den gewöhnlichen Kulturhefen, und zwar mit Unter- oder Oberhefe, so kommt beim Aufschlemmen geeigneter Hefemengen in Rohrzuckerlösungen der gesamte Saccharasegehalt der Hefe zur Wirkung, und zwar unabhängig davon, ob die Zellen durch Trocknen (bei Zimmertemperatur) entwässert oder durch Toluol bzw. Chloroform an Zuwachs oder Gärtätigkeit gehemmt werden oder frisch zur Anwendung kommen. Dieses Resultat ist auch durch Willstätter und Racke eingehend bestätigt worden, welche nachwiesen, dass Zerreiben der Zellen usw. die enzymatische Tätigkeit der Hefenmasse nicht erhöht. Nur schien aus einer Reihe von Beobachtungen an abgetöteter Hefe hervorzugehen, dass die Hefezelle „neben der fertigen Saccharase in untergeordnetem Masse eine Vorstufe derselben enthält" (l. c. S. 37), vgl. S. 197.

Die Bestimmung des Saccharasegehalts der Hefe führt man, um die Resultate unmittelbar vergleichen zu können, am besten unter ein für allemal festgelegten Bedingungen aus.

---

[1]) Euler und Svanberg, H. 106, 201; 1919.

[2]) Denn bei 18° ist L max = R max. (0,44—t · 0,005) = 0,36 R max und log (1,36/0,36) = 0,5772 ∴ Inversionskonst. $= k = \frac{0{,}5772}{t} \therefore If = \frac{k \cdot g\,Zucker}{g\,Substanz} = \frac{0{,}5772 \cdot 4}{t \cdot 0{,}05} = \frac{46{,}176}{t}$.

[3]) O'Sullivan, Jl Chem. Soc. 61, 593; 1892/3. — Euler und Kullberg, H. 71, 29; 1910.

In den meisten neueren Bestimmungen aus dem Stockholmer Laboratorium wurde 0,5 g frische Hefe (etwa 30% Trockengewicht) in 60 ccm 8 prozentiger Rohrzuckerlösung, welche rund 1% Phosphat enthielt, aufgeschlemmt.

Wir gehen dazu über, 1 g frische Hefe, deren Trockengewicht bestimmt wird, in 100 ccm 8-prozentiger Rohrzuckerlösung aufzuschlemmen, welche durch Zusatz von 1% Phosphatpuffer auf pH = 4,5 gebracht ist.

Nur bei schwacher Saccharasewirkung ist Zusatz von Toluol notwendig.

Die Hemmung der von Zeit zu Zeit dem Reaktionsgemisch zu entnehmenden Proben geschieht durch Sodalösung, von welcher die Hefe baldmöglichst abfiltriert wird, oder durch Sublimatlösung.

Willstätter und Racke (l. c. S. 12) empfehlen Anwendung von 16-prozentiger Rohrzuckerlösung und suspendieren 2,00 g frische Hefe in 100 ccm.

Willstätter drückt die Wirksamkeit der Hefe wie die von Präparaten durch den Zeitwert aus.

Euler und Svanberg[1]) führen das Inversionsvermögen, Inv. ein und berechnen es durch den Ausdruck:

$$\text{Inv.} = \frac{k \cdot g\,\text{Zucker}}{\text{Zellenzahl}}.$$

Für die Umrechnung in die Inversionsfähigkeit If (vgl. S. 202) muss man die Zellenzahl der Hefe pro Gewichtseinheit kennen. Für frische Hefe ist, wie für Präparate

$$\text{If} = \frac{k \cdot g\,\text{Zucker}}{g\,\text{Hefe}}.$$

Nicht für alle Hefen ist es ohne weiteres angängig, den Saccharasegehalt in obiger Weise zu bestimmen. Es machen sich hier die gleichen Schwierigkeiten geltend, wie bei der Bestimmung der Maltase und Laktase, und es muss in dieser Hinsicht auf die Originalarbeiten verwiesen werden[2]).

Anhang: Anti-Saccharase.

Über die Existenz einer spezifischen Antisaccharase[3]) können bis jetzt noch keinerlei endgültige Angaben gemacht werden. Schuetze und Bergell haben sich nach ihren 1907 an Kaninchen ausgeführten Versuchen allerdings sehr entschieden ausgesprochen:

„Es ist ... durch unsere Tierversuche bewiesen, dass durch eine monatelang fortgesetzte Behandlung von Kaninchen mit subkutanen Injektionen von Invertin sich ein Serum gewinnen lässt, welches Invertin in nachweisbarer Weise beeinflusst."

[1]) Euler und Svanberg, H. 106, 201; 1919. — Siehe auch Euler und Cramér, H. 88, 430; 1913.

[2]) Willstätter, Oppenheimer und Steibelt, H. 110, 232; 1920; H. 111, 157; 1920. — Willstätter und Oppenheimer, H. 118, 168; 1921. — Euler und Josephson, H. 120, 42; 1922.

[3]) Siehe hiezu Teil I, S. 275.

Indessen ist zunächst hervorzuheben, dass die Spezifität der von den genannten Forschern beobachteten Hemmung nicht nachgewiesen ist. Auch was überhaupt den Eintritt einer Hemmung oder genauer, die Vergrösserung der normalen Saccharasehemmung durch Serum nach Enzyminjektion betrifft, ein Effekt, der eventuell unspezifisch sein könnte, so sind weitere Versuche wünschenswert[1]); denn selbst wenn man von der schnellen Bildung von Antikörpern nach Enzyminjektion im Blut überzeugt ist, bleibt zu bedenken, dass die bis jetzt injizierten Saccharasepräparate aus Hefe stammten[2]), deren Rohrzucker-spaltendes Enzym mit der Blutsaccharase vermutlich nicht identisch ist (vergl. S. 164).

Neue Versuche, welche E. v. Knaffl-Lenz im hiesigen Laboratorium begonnen hat (H. 120, 110; 1922), konnten auch keinen Beweis für die Existenz einer Antisaccharase liefern.

Raffinase (Frukto-Raffinase).

Die Annahme eines besonderen Raffinose spaltenden Enzyms stützt sich besonders auf die neuen Untersuchungen von Willstätter und Kuhn[3]).

Substrat. Raffinose; Nadeln oder Prismen vom Schmpt. 80°.

$[\alpha]_D = 104^0 - 105{,}7^0$. Reduziert nicht Fehlingsche Lösung. Wird enzymatisch in zweierlei Weise gespalten:

1. in Fruktose und Melibiose durch die Raffinase,

2. in Galaktose und Rohrzucker durch eine Komponente des Emulsins (Neuberg)[4]), woraus die Anordnung der 3 Hexosen im Molekül hervorgeht:

$$\underbrace{\text{Fruktose} - \overbrace{\text{Glukose}}^{}}_{\text{Rohrzucker}} \overbrace{- \text{Galaktose}}^{\text{Melibiose}}$$

Vorkommen in Hefen.

Das Raffinose spaltende Enzym findet sich in vielen Hefen, aber nicht in allen, auch nicht in allen denen, welche Rohrzucker spalten. Nach Lindner vergären Monilia candida Hansen und Hefe Nr. 602 des Berliner Instituts für Gärungsgewerbe (gewonnen aus Danziger Jopenbier) Rohrzucker, greifen aber Raffinose nicht an. Schizosaccharomyces octosporus Beijerinck und Hefe Nr. 370 sollen umgekehrt Raffinose, nicht aber Rohrzucker vergären.

---

[1]) Über Hemmungen der Saccharasewirkung durch Serum siehe auch Anselm Eriksson (H. 72), dessen Ergebnisse allerdings auch durch Nichtkonstanz der Aziditätsbedingungen beeinflusst sein können.

[2]) Nach Schuetze und Braun (Zs. Klin. Med. 64, 509, 1907) wirkt Antimalzamylase nicht auf tierische Amylasen.

[3]) Willstätter und Kuhn, H. 115, 180; 1921.

[4]) Neuberg, Biochem. Zs 3, 519; 1907.

Dass die Quotienten der Raffinase- und Saccharasezeitwerte in verschiedenen obergärigen Hefen keineswegs gleich sind, ersieht man aus folgendem Auszug aus einer von Willstätter und Kuhn gegebenen Tabelle:

Hefe	Vergleichszeitwerte		Quotient
	Rohrzucker	Raffinose	
Brennereih. Kopenhagen . .	0,52	2,65	5,1
Spiritusb. Stadlau	12,1	65	5,4
Brennereih. Rasse XII . . .	1,26	15,6	12,3
Brennereih. M	2,62	18,3	7
Branntweinb. Sinner . . .	3,36	24,9	7,4

Der Quotient der Zeitwerte variiert hier im Verhältnis 1:2,5. Man kann hieraus mit Willstätter den Schluss ziehen, „dass die Spaltung der beiden Zuckerarten (Rohrzucker und Raffinose) nicht auf ein und dasselbe Enzym zurückgeführt werden kann“. Immerhin ist es auffallend, mit wie grosser Annäherung die enzymatischen Spaltungen der beiden Zuckerarten in den verschiedensten Hefen parallel laufen, und der Eindruck dieser weitgehenden Parallelität wird noch verstärkt durch folgenden Auszug aus Willstätters und Kuhns Tabelle, welche die Quotienten der Raffinase- und Saccharase-Zeitwerte von Saccharasepräparaten angibt[1]), die verschiedenen Reinigungsverfahren unterworfen worden sind.

Präparat	Quotient
Nur durch $Al(OH)_3$ gerein. Zeitw. 4,8. Frei v. Melibiase	11,2
Dass. Präp., weiter d. Kaolinads. gerein. Zeitw. 0,86	11,2
Ebenso gerein., dann mit Uranacetat behandelt. Zeitw. 1,96	11,4
Präp. aus frakt. enzym. Hefeabbau, d. Ads. gerein. Zeitw. 1,4	9,3

Der Umstand, dass der Quotient nicht den Wert 1 besitzt, sagt natürlich an sich nichts über die Existenz oder Nichtexistenz einer besonderen Raffinase aus, denn ein und derselbe Katalysator wird in der Regel zwei verschiedene Substrate mit verschiedener Geschwindigkeit spalten, z. B. eine organische Säure zwei verschiedene Ester[2]). Die Verschiedenheit der Quotienten deutet auf die Existenz zweier verschiedener Katalysatoren, aber die geringe Variation lässt vermuten, dass die beiden Katalysatoren so grosse physikalische und chemische Ähnlichkeiten besitzen wie etwa die Angehörigen homologer Reihen und es wäre weiter denkbar, dass diese beiden homologen Katalysatoren die

[1]) H. E. Armstrong u. Glover (Proc. Roy. Soc. B. 80, 312; 1908) hatten mit einer nicht näher definierten Saccharaselösung den Quotienten (für 50% Hydrolyse) zu 5,4 gefunden.

[2]) E. F. Armstrong u. Caldwell (Proc. Roy. Soc. B. 73, 526; 1904 u. 74, 195; 1905) fanden für die relative Geschwindigkeit der Hydrolyse durch katalysierende, stark dissoziierte Säuren die folgenden Werte:

Laktose	1	Rohrzucker	1240
Maltose	1,27	Raffinose	1040.
α-Methylglukosid	0,17		

beiden Substrate angreifen, aber mit verschiedenen absoluten und relativen Geschwindigkeiten. Die beiden eingangs erwähnten Befunde von Lindner an Monilia candida und an Schizosaccharomyces octosporus betreffen nur die Vergärung und würden, auch wenn sie sich bestätigen, überhaupt keinen Einwand bilden, falls man mit Willstätter besondere Zymasen für die Vergärung der einzelnen zusammengesetzten Zuckerarten annimmt.

Die Auffassung, dass die Hydrolyse von Raffinose und Rohrzucker von demselben Enzym bewirkt wird, wurde früher von E. Fischer[1]), A. Bau[2]), H. E. Armstrong, l. c., E. F. Armstrong[3]), Hérissey[4]) und C. S. Hudson[5]) vertreten.

Nach Bourquelot[6]) und Gillot[7]) kommt Raffinase in Schimmelpilzen vor. Eine neuere und umfassendere Untersuchung der Raffinosespaltung durch Schimmelpilze verdankt man Pringsheim und Zemplén[8]). Collin[9]) hat die Hydrolyse der Pilzsaccharide durch Botrytis cinerea studiert.

Invertebraten: Mollusken und Crustaceen. In zahlreichen wirbellosen Tieren haben Bierry und Giaja ein Enzym nachweisen können, welches Raffinose spaltet; so Bierry und Giaja[10]) im Magen-Darmsaft von Helix, Giaja[11]) zum Teil gemeinschaftlich mit Gompel in Mollusken, Crustaceen und Insekten.

Bierry bezeichnet das Enzym, welches u. a. Trisacchariden auch Raffinose aufspaltet, als Lävulopolyase. Bierry sowie Bourquelot und Bridel betonen, dass im allgemeinen die Fruktose zuerst aus der Raffinose freigemacht wird, so dass Melibiose zurückbleibt, welche dann weiter zerlegt wird.

In höheren Tieren ist eine enzymatische Spaltung der Raffinose mehrmals vergeblich gesucht worden (E. Fischer und Niebel, l. c.); keinesfalls ist eine solche Spaltung mit Sicherheit nachgewiesen[12]). Dieser Umstand macht es auch schwer, die Aufteilung der Raffinose in Fruktose und Melibiose der Saccharase zuzuschreiben.

---

[1]) Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. d. Preuss. Akad. 5, 73; 1896. — E. Fischer, H. 26, 60; 1898. — Siehe auch Pantz und Vogel (Zs f. Biol. 32, 304; 1895), nach welchen Raffinose durch den Dünndarm des Hundes und Pferdes nicht gespalten wird.

[2]) Bau, Wochenschr. f. Brau. 17, 698; 1900.

[3]) E. F. Armstrong, The simple Carbohydrates. 3. Aufl. London 1919.

[4]) Hérissey und Lefèvre, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 26, 56; 1907.

[5]) C. S. Hudson, Jl Amer. Chem. Soc. 36, 1566; 1914. — C. S. Hudson u. Harding, ebenda 37, 2193; 1915.

[6]) Bourquelot, Soc. Biol. 48, 205; 1896.

[7]) Gillot, Bull. Acad. R. sc. Belg. 1899, 211 und 1900, 99.

[8]) H. Pringsheim und Zemplén, H. 62, 367; 1909.

[9]) Collin, Thèses, Paris 1911.

[10]) Bierry und Giaja, Soc. Biol. 61, 485; 1906. — Bierry, Biochem. Zs 44, 426; 1912.

[11]) Giaja und Gompel, Soc. Biol. 62, 1197 und 63, 508; 1907. — Giaja, Thèses, Paris 1909.

[12]) Möglicherweise findet eine Hydrolyse der Raffinose im Darm durch Vermittlung von Bakterien statt (Kuriyama und Mendel, Jl of Biol. Chem. 31, 124; 1917).

Über die zweite Art der Raffinosespaltung durch Emulsin siehe Neuberg, Biochem. Zs 3, 519; 1907.

Wirkungsbedingungen der enzymatischen Raffinosespaltung.

Es handelt sich hier fast durchweg um das von Willstätter und Kuhn studierte Hefenenzym.

Azidität. Aus der von Willstätter und Kuhn ermittelten Kurve (Fig. 32), geht hervor, dass das Aziditätsoptimum der Raffinosespaltung recht nahe mit demjenigen der Rohrzuckerspaltung (vgl. S. 185) zusammenfällt; es liegt bei etwa pH = 5. Dagegen scheint die erstgenannte Reaktion gegen höhere Aziditäten (pH = 2) weniger empfindlich zu sein. Die Kurve gilt für die Temperatur von 30°.

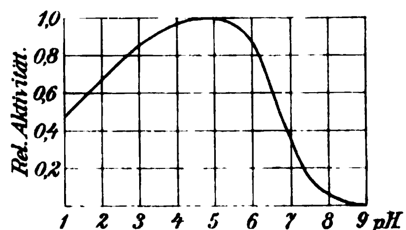


Fig. 32.

Kinetik.

„Auch in den anderen Voraussetzungen der Bestimmung gleichen sich Raffinase und Saccharase. Proportionalität von Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge trifft für die Spaltung der Raffinose in demselben Bereich von 1:40 zu, wie für die Rohrzuckerinversion".

Enzymmenge ccm in 25	Minuten	Drehungsabnahme	Spaltung %	Minuten	Drehungsabnahme	Spaltung %
0,25	400	1,62°	24,8	600	2,28°	34,9
0,5	200	1,67	25,6	300	2,33	35,7
1,0	100	1,67	25,6	150	2,37	36,3
2,5	40	1,71	26,2	60	2,41	36,9
5,0	20	1,71	26,2	30	2,41	36,9
10,0	10	1,70	26,0	15	2,38	36,5

Der zeitliche Verlauf der Spaltung erinnert ebenfalls an die für die Saccharase bekannt gewordenen Verhältnisse. Die Gültigkeit der Reaktionsgleichung erster Ordnung ist zuerst von H. E. Armstrong und Glover behauptet worden. Dies wird innerhalb der Grenzen von 30—60% Spaltung von Willstätter und Kuhn bestätigt. Diese Forscher haben also mit Hilfe der theoretischen Kurve ihre gefundenen Werte auf 50%ige Hydrolyse interpoliert.

Minuten	Drehung	Spaltung %	$k \cdot 10^4$	Minuten	Drehung	Spaltung %	$k \cdot 10^4$
0	13,71°	0,0	—	60	11,14°	39,4	36,2
10	13,26°	6,9	31,0	80	10,55°	48,4	35,9
20	12,76°	14,5	34,0	110	9,80°	60,0	36,2
30	12,30°	21,6	35,2	160	9,00°	72,1	34,6
45	11,67°	31,3	36,2	220	8,35°	82,1	34,0
				∞	7,18°	100	—

Methoden zur Bestimmung der Raffinase.

Die Spaltung der Raffinose in Melibiose und Fruktose wird polarimetrisch verfolgt. Willstätter und Kuhn (l. c.) ermitteln als Zeitwert „die Anzahl Minuten, welche 0,5 g Trockengewicht von Hefe oder Enzympräparat brauchen würden, um bei 30° und optimalem pH in 25 ccm 2,061 g $C_{18}H_{32}O_{16} \cdot 5\,H_2O$ zu 50% zu spalten. Die vollständige Hydrolyse liefert 2,5%ige Fruktoselösung. Das Aziditätsoptimum (pH = 4,5) wurde durch Zusatz von 1 ccm 20%iger NaH_2PO_4-Lösung eingestellt".

Gentianase (Frukto-Gentianase).

Substrat: Gentianose, $C_{18}H_{32}O_{16}$, kommt in den Wurzeln der Gentianaarten vor. Schmelzp. 209—211°. $[\alpha]_D = +31{,}2° - 33{,}4°$. Säuren spalten in 1 Mol. Fruktose und 2 Mol. Glukose. Die Anordnung der Hexosen geht aus folgendem Schema hervor:

$$\overbrace{\text{Fruktose — Glukose}}^{\text{Rohrzucker}}\text{ — Glukose}$$
$$\text{Fruktose — }\underbrace{\text{Glukose — Glukose}}_{\text{Gentiobiose}}$$

Vorkommen: Ein Hefenenzym bewirkt die Spaltung in Fruktose und Gentiobiose, während durch Emulsin und besonders durch Extrakte aus Aspergillus niger die Aufteilung in Rohrzucker und Glukose ermöglicht wird (Bourquelot)[1]).

Durch Enzymgemische aus Invertebraten, besonders Schnecken, erfolgt nach Bierry[2]) zuerst die Abtrennung von Fruktose, dann die Spaltung der Gentiobiose.

Die Eigenschaften der Gentianase und ihre Beziehung zur Raffinase und Saccharase sind noch nicht ausreichend untersucht. Die Annahme eines besonderen Enzymes ist also vorläufig noch hypothetisch.

Frukto-Stachyase.

Substrat: Stachyose, zuweilen auch Mannotetrose benannt, $C_{24}H_{42}O_{21} + 4\,H_2O$, wird nach Schulze und Planta[3]), sowie Winterstein[4]) aus Stachys tubifera und aus dem Wurzelsystem von Lamium album und Labiaten, sowie aus weissem Jasmin gewonnen. Identität mit Lupeose noch unbestimmt.

---

[1]) Bourquelot, C. r. 126, 1045; 1898. — 133, 690; 1902. — Jl de Pharm. et Chim (6) 16, 578; 1902. — Bourquelot und Hérissey, C. r. 132, 571; 1901. — 135, 290 u. 399; 1902. — 136, 762; 1903. — Bourquelot und Bridel, Jl de Pharm. et Chim. (7) 3, 569; 1911. — C. r. 152, 1060; 1910.

[2]) Bierry, C. r. 148, 949; 1909. — Biochem. Zs 44, 426; 1912.

[3]) Schulze und v. Planta, Chem. Ber. 23, 1692; 1890. — 24, 2705; 1891. — 43, 2230; 1910.

[4]) Winterstein, Landw. Versuchsst. 41, 375.

Verlust des Krystallwassers bei 115—120°. Schmelzp. des Anhydrids 167° bis 170° (Tanret)[1]). Für die Hydratform ist $[\alpha]_D = 133{,}9°$ (Neuberg)[2]).

Lupeose (Schulze, Chem. Ber. 43) aus Lupinensamen ist nach Tanret (C. r. 155) vermutlich mit Stachyose identisch.

Enzymatische Spaltung. Die Anordnung der vier Hexosereste im Molekül und die Wirkung der Enzyme geht aus folgendem Schema hervor:

Fruktose — Glukose — Galaktose — Galaktose
(Glukose — Galaktose — Galaktose:) Mannotrisaccharid
(Hefenenzym und Kefirlaktase).

Das Mannotrisaccharid hat Neuberg als Osazon isoliert.

Das spaltende Hefenenzym wurde von Neuberg (l. c.) nach der von E. Fischer für Maltase angegebenen Vorschrift dargestellt und deswegen entsprechend bezeichnet. Über die Identität dieses Enzyms mit anderen hydrolysierenden Enzymen dieser Gruppe, besonders mit Saccharase, liegen noch keine Anhaltspunkte vor[3]).

Auch von Enzymen aus dem Magen-Darmkanal von Wirbellosen wird Stachyose nach Bierry[4]) gespalten, und zwar nimmt dieser Forscher drei Stufen und drei Enzyme an.

Die andere mögliche Spaltung in Rohrzucker und Digalaktose durch Emulsin ist noch hypothetisch, wie besonders aus der Untersuchung von Neuberg hervorgeht.

Verbaskose aus Verbascum Thapsus ist ein vermutlich mit Stachyose isomerer Zucker (Bourquelot u. Bridel, C. r. 151). Über die enzymatische Spaltung ist nichts bekannt.

Melizitase

aus Aspergillus niger soll Melizitose (Melizitotriose) in 1 Mol. Glukose und 1 Mol. Turanose zerlegen (Bourquelot[5]).

Rhamnino-Rhamnase oder Rhamno-Rhamninase

aus Helix pomatia spaltet nach Bierry[6]) Rhamninose (aus Xanthorhamnin) in 2 Mol. Rhamnose und 1 Mol. Galaktose.

[1]) Tanret, C. r. 134, 1586; 1902. — 136, 1569; 1903. — Bull. Soc. Chim. 27 u. 29.

[2]) Neuberg und Lachmann, Biochem. Zs 24, 171; 1910. — Siehe auch Neuberg, ebenda 3, 519; 1907.

[3]) Siehe hierzu auch Vintilesco, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 30, 167; 1909.

[4]) Bierry, Biochem. Zs 44, 446; 1912.

[5]) Bourquelot u. Hérissey, Bull. Soc. Mycol. France 9; 1893.

[6]) Bierry, Soc. Biol. 66, 738; 1909.

6. Kapitel.

β-Glukosidasen.

In diesem Kapitel werden Reaktionen behandelt, welche durch Komponenten des Emulsins beschleunigt werden. Bekanntlich ist das Emulsin kein einheitliches Enzym, sondern eine Mischung solcher Stoffe, welche β-Hexoside, besonders β-Glukoside sowie auch β-Bioside katalytisch spalten. Als Hauptgruppen der Substrate der Emulsinkomponenten kann man angeben:

Alkyl- und Arryl-β-Glukoside und Gluko-β-Glukoside.

A. Allgemeines über Emulsin.

1. Ausgangsmaterial zur Darstellung des Emulsins. Vorkommen.

Da das Emulsin nicht an einem bestimmten, sondern an verschiedenen Substraten geprüft worden ist, besteht gegenwärtig kaum eine genauere Definition für dieses Präparat als die, dass es in wässeriger Lösung natürliche Glukoside spalten soll; dabei wurden zur Prüfung unter natürlichen Glukosiden meist die in höheren Pflanzen vorkommenden Verbindungen der Glukose mit aromatischen Resten ausgewählt, also Stoffe vom Salizin-Typus, oder es wurde die Wirkung speziell an Amygdalin geprüft, was wohl zum Teil auf historischen Gründen beruht; die Wirkung des 1830 von Robiquet und Boutron[1]) entdeckten, von Liebig und Wöhler[2]) „Emulsin" benannten Stoffes haben letztere Forscher nämlich 1837 gerade am Amygdalin untersucht. Robiquet sprach bald darauf die Vermutung aus, dass der auf Amygdalin wirksame Stoff von derselben Art sei, wie die Diastase und nannte ihn Synaptase.

Als Ausgangsmaterial für die im Handel vorkommenden Emulsinpräparate werden meist süsse oder bittere Mandeln verwendet. Doch kommen glukosidspaltende Enzyme keineswegs nur in Mandeln vor, vielmehr sind sie sehr verbreitet in verschiedenen Organen zahlreicher Pflanzen, und zwar soll sich Emulsin auch in solchen Pflanzen finden, welche keine eigentlichen β-Glukoside enthalten; diese Angaben bedürfen allerdings noch einer Prüfung.

---

[1]) Robiquet et Boutron, Ann. de Chim. et Phys. (2) 44, 352; 1830. — Jl de Pharm. 23, 589; 1837. — Robiquet, ebenda 24, 196; 1838. — Lieb. Ann. 25, 175; 1838.

[2]) Liebig und Wöhler, Ann. Pharm. 22, 1; 1837. — Pogg. Ann. 41, 345.

Nächst den Mandeln sind als Ausgangsmaterial für die Darstellung zunächst die Samen anderer Prunaceen zu nennen, z. B. von Prunus domestica und Prunus persica.

Eingehende Untersuchungen über das Vorkommen von „Emulsin" in Organen höherer Pflanzen verdankt man Bourquelot und besonders seinem Mitarbeiter Hérissey[1]), sowie Guignard[2]), Tanret, Bertrand, H. E. und E. F. Armstrong und Horton[3]) und Rosenthaler[4]). Aus allen Angaben geht hervor, dass die grössten Emulsin-Ausbeuten aus Rosaceen gewonnen werden, es kommen also ausser den Prunaceen auch noch die anderen Unterfamilien in Betracht, und zwar gewinnt man Emulsin nicht nur aus den Samen[5]), sondern auch aus den Stielen und Blättern, so z. B. beim Kirschlorbeer, Prunus laurocerasus, bei Prunus serotina u. a.

Über das Vorkommen im übrigen mag hier noch erwähnt werden:

Samen: Körner von Hülsenfrüchten nach Bertrand und Rivkind[6]). Samen von Ericineen und Ribesarten. Polygala[7]). Gekeimte Gerste[8]), Tabak[9]).

Wurzeln: Orchideen nach Guignard[10]). Enzian[11]). Verbascum Thapsus (Harlay 1905). Gräser.

Blätter: Aucuba japonica[12]), Sambucus-Arten[13]), Tabak[9]).

Rinde: Betula alba, Fraxinus excelsior (Bourquelot).

Milchgefäss-System des Embryo: Euphorbiaceen (Manihot-Arten) (Guignard).

In niederen Pflanzen hat ausser Bourquelot und Hérissey besonders Gérard[14]) das Vorkommen von Emulsin studiert. Kulturhefen spalten Amygdalin, Salicin, Arbutin (Henry und Auld, Proc. 76. — Neuberg und Färber, Biochem. Zs 78).

In vielen Flechten hat Hent[15]) Emulsin gefunden.

---

[1]) Hérissey, Recherches sur l'émulsine. Thèses, Paris 1899.

[2]) Guignard, C. r. 110, 477; 1890. — Jl de Bot. 4, 3; 1890. — Zum Teil hat Guignard den Nachweis des Emulsins auf Farbenreaktionen gegründet, welche mit den Wirkungen von Glukosidasen nichts zu tun haben. Die betreffenden Angaben erfordern eine Nachprüfung.

[3]) H. E. und E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 85, 363; 1912.

[4]) Rosenthaler, Arch. d. Pharm. 251, 56; 1913.

[5]) Bourquelot und Hérissey, C. r. 137, 56; 1903. — Äpfel- und Birnensamen sollen nur geringe Emulsinwirkung zeigen (Huber, Landw. Versuchsst. 75, 462; 1911).

[6]) Bertrand und Rivkind, C. r. 143, 970; 1906. — Bull. Soc. Chim. (4) 1, 497; 1906.

[7]) Bourquelot, Jl de Pharm. et de Chim. (5) 30, 433; 1894.

[8]) Maestrini, Atti Acad. d. Lincai 29 (5), 164; 1920.

[9]) Oosthuizen u. Shedd, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1289; 1913. — Traetta Mosca, Gazz. chim. ital. 43, II. 431; 1914.

[10]) Guignard, C. r. 141, 637; 1905.

[11]) Bourquelot und Hérissey, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 16, 513; 1902.

[12]) Bourquelot und Hérissey, Soc. Biol. 56, 655; 1904. — C. r. 138, 114; 1114; 1904.

[13]) Guignard, C. r. 141, 16; 1905.

[14]) Gérard, Soc. Biol. 45, 651; 1893. — Jl de Pharm. et de Chim. (5) 28, 11; 1893.

[15]) Hent, Arch. d. Pharm. 239, 581; 1900.

Ein ausführliches Referat der Angaben über das Vorkommen von „Emulsin“ kann hier um so eher unterbleiben, als diese Angaben sich meist nur auf eine Komponente des Emulsins beziehen.

Es ist eine Aufgabe der künftigen Forschung, die Verteilung der wichtigsten definierten Enzyme des Emulsins in den verschiedenen Pflanzen und Pflanzenorganen festzustellen.

Darstellung des Mandel-Emulsins.

Man hat bis jetzt meist nach der Vorschrift von Hérissey (Thèses, S. 44) oder von Bourquelot (Jl de Pharm. (6) 24; 1906. — Arch. de Pharm. 245, 172; 1907) gearbeitet:

100 g süsse Mandeln taucht man während etwa 1 Minute in kochendes Wasser, lässt abtropfen und entschält sorgfältig; man zerstösst sie in einem Marmormörser ohne Zugabe von Wasser möglichst fein. Man weicht das erhaltene Produkt in 200 ccm einer Mischung von gleichen Teilen reinen, destillierten und chloroformgesättigten Wassers bei Zimmertemperatur ein. Nach 24 Stunden koliert man durch ein angefeuchtetes Siebtuch. Man gewinnt auf diese Weise 150—160 ccm Lösung, welcher man tropfenweise Eisessig zugibt, um das Kasein[1]) zu fällen; hierauf filtriert man durch ein nasses Filter. Die trübe Flüssigkeit (120—130 ccm) wird nun mit 500 ccm 95%igem Alkohol versetzt; man sammelt den Niederschlag auf ein Faltenfilter, lässt abtropfen, gibt eine Mischung von Alkohol und Äther zu und trocknet dann im Vakuum über Schwefelsäure. Man erhält durchsichtige, hornartige Blätter, welche durch Zerreiben ein fast rein weisses Pulver liefern.

Im hiesigen Laboratorium hat E. Nordefeldt[2]) ebenfalls Emulsin aus Mandeln dargestellt; das Ausziehen des Mandelbreies geschah, wie es auch Willstätter und Csányi empfehlen, mit sehr schwach alkalischer Lösung; es hat sich als eine zweckmässige Verbesserung erwiesen, den Extrakt nicht mit Alkohol, sondern mit Azeton zu fällen.

Willstätter und Csányi[3]) geben folgende ausführliche Vorschrift:

„Die Mandeln werden zunächst in trockenes, ölfreies Pulver verwandelt. Um sie zu enthäuten, erwärmt man sie $^1/_4$ Stunde mit Wasser von 60°—70°. Man trocknet sie oberflächlich an der Luft, zerkleinert sie in der Mandelmühle und entzieht ihnen in der hydraulischen Presse die Hauptmenge des Öles. Darauf werden sie mit dem Dreifachen an Äther in einer Flasche extrahiert, nach dem Absaugen in einer Walzenmühle gemahlen und nochmals mit der doppelten Menge Äther ausgezogen, abgesaugt und nachgewaschen. Das in einem warmen Luftstrom getrocknete Material wird in einer Siebmühle aufs feinste gemahlen. An Pulver, das für die Bestimmungen im Vakuumexsikator zu trocknen ist, erhält man etwa $^1/_3$ vom Gewicht der Mandeln. Beim Aufbewahren nimmt es an enzymatischer Wirkung ab, z. B. in einem halben Jahre um 10%.

---

1) Richtiger das Protein der Mandeln.

2) Nordefeldt, Biochem. Zs 130; 1922.

3) Willstätter und Csányi, H. 117, 172; 1921.

Verschiedene Proben aus süssen wie aus bitteren Mandeln ergaben ziemlich übereinstimmende Zeitwerte für Amygdalinspaltung: 425, 480 und 500.

100 g Mandelpulver werden in einer Flasche mit 250 ccm n/10-Ammoniak verrührt und nach Verdünnen mit weiteren 100 ccm Wasser 5 Stunden lang mit der Maschine geschüttelt. Den ammoniakalischen Auszug trennt man am besten mittels der Zentrifuge von den Rückständen, um diese sogleich in den Zentrifugengläsern wieder mit 100 ccm Wasser unter Zusatz von 10 ccm n/10 Ammoniak anzurühren, von neuem zu zentrifugieren und ebenso einen dritten Auszug zu bereiten, abermals, falls die alkalische Reaktion verschwunden ist, unter Zusatz einiger Kubizentimeter Ammoniak. Die vereinigten Auszüge, etwa $^1/_2$ Liter, erhalten 60% der Trockensubstanz der Mandeln. Einen grossen Teil der Eiweissstoffe, etwa 8% vom Pflanzenmaterial, fällen W. u. C., wie üblich, mit verdünnter Essigsäure (300 ccm n/10 oder 60 ccm n/2) aus; der Niederschlag enthält 5—8% vom Emulsin.

Das Filtrat gibt schon mit wenig 95%igem Alkohol (30% seines Volumens) eine Fällung, die hauptsächlich aus Eiweiss und Gummi besteht, aber auch zirka 20% der Enzyme einschliesst. Trennt man diese Fraktion ab, so wird das Rohprodukt des Emulsins reiner. Aber da für das Präparat doch eine Umfällung erforderlich ist, bewährt es sich nicht, die etwas verlustbringende fraktionierte Fällung vorzunehmen. Man fällt daher die Lösung mit der vierfachen Menge Sprit und isoliert mittels der Zentrifuge den rein weissen Niederschlag, der mit absolutem Alkohol und Äther gewaschen wird."

„Das Rohprodukt betrug exsikkatortrocken 2,5—3,5 g, beispielsweise vom Zeitwert 25, 22, 18, 16, was Ausbeuten von etwa 60—75% der Theorie entspricht."

„Durch die Fällung und Trocknung ist ein Teil des noch beigemengten Proteins unlöslich geworden. Daher lässt sich der Reinheitsgrad leicht durch Umscheiden verbessern. Das feine Pulver teigt man mit wenig Wasser in der Reibschale an und spült es mit dem Dreissigfachen von Wasser in die Zentrifugengläser über, in denen die Lösung geklärt wird. Darauf fällt man das Emulsin zum zweiten Male mit Alkohol, wenn es für die Ausflockung nötig ist unter Zusatz einer Spur Kalziumchlorid. Diese Reinigung lässt sich fast ohne Verlust ausführen, die umgefällten Präparate wiesen Zeitwerte von 10—18 auf."

„Die Emulsinpräparate sind in Wasser klar löslich, hellbräunlich bei grosser Konzentration. Die Lösung wird durch Salzsäure gefällt."

Willstätters und Csányis Präparat zeigte auch nach langem Erwärmen mit Wasser keine reduzierende Wirkung auf Fehlingsche Lösung; bei langdauerndem Erwärmen mit verdünnter Säure tritt etwas Reduktionswirkung auf. Die genannten Autoren finden stets noch schwache Millon- und Biuretreaktion und Xanthoproteinreaktion; ihr Präparat vom Zeitwert 18 zeigte $[\alpha]_D = -60°$.

Das von Nordefeldt durch Umfällen und Dialyse gereinigte Präparat (nur auf Oxynitrilase geprüft) ergab nach Säurehydrolyse eine Reduktion nach Bertrand, auf Glukose berechnet, von 10 %. Ferner findet Nordefeldt in seinem Präparat ein Globulin[1]), vermutlich das von Osborne untersuchte Amandin. Ausserdem 5 % Asche (besonders Ca- und Mg-Phosphat); eine Drehung $[\alpha]_D = -48^\circ$, etwas geringer als die des Amandins (vergl. S. 256 u. ff.).

Die Herstellung anderer, β-Glukosidasen und Oxynitrilasen enthaltenden Präparate findet man bei den betreffenden Enzymen behandelt.

Aus den Untersuchungen von H. E. und E. F. Armstrong und Horton[2]), sowie von Caldwell und Courtauld und ferner von Rosenthaler ging mit Sicherheit hervor, dass im Mandel-Emulsin wenigstens vier Enzyme enthalten sind, nämlich folgende:

1. Amygdalase, welche das Amygdalin in Mandelsäurenitrilglukosid und Glukose spaltet (siehe S. 161).

2. Eine β-Glukosidase (Prunase), welche Mandelsäurenitrilglukosid in Benzoylnitril und Glukose zerlegt (siehe S. 238).

3. Eine Oxynitrilase (siehe S. 253 u. ff.).

4. Eine Laktase[3]).

Nach Pottevin[4]) hydrolysieren die Emulsinpräparate aus Aspergillus niger Milchzucker und überhaupt β-Galaktoside nicht, und wurden daher als physiologisch reiner angesehen. Eine wirkliche Charakterisierung der Emulsinpräparate kann natürlich nur durch die quantitative Angabe der Wirksamkeit in bezug auf die verschiedenen Reaktionen erreicht werden. Eine grundlegende Arbeit hierüber verdankt man Willstätter und Csányi[5]), welche die Zeitwertquotienten der β-Methylglukosid-, Laktose- und Raffinosespaltung zur Amygdalinspaltung, der Laktose- zur Prunasin-, der β-Glukosid- zur Prunasinspaltung in verschiedenen Ausgangsmaterialen und Emulsinpräparaten verglichen.

B. Alkyl-β-Glukosidase.

Substrat[6]): β-Methylglukosid, $CH_3 \cdot OC_6H_{11}O_5$; die farblosen Prismen schmelzen bei 104°; $[\alpha]_D = -33^\circ$. Durch Säuren wird das β-Glukosid nach van Ekenstein[7]) etwa 3 mal so schnell hydrolysiert wie die α-Verbindung, nach Armstrong und Glover[8]) 1,8 mal.

---

[1]) Ohta (Biochem. Zs 58, 329; 1914) hat eine Befreiung des Emulsins von Eiweiss vorgenommen, wobei allerdings nur sehr wenig wirksame Präparate erzielt wurden (vergl. Willstätter und Csányi, S. 174). Siehe hierzu auch Hérissey, Thèses, Paris.

[2]) H. E. und E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 80, 321; 1908.

[3]) Bourquelot und Hérissey, Soc. Biol. 55, 219; 1903.

[4]) Pottevin, Ann. Inst. Pasteur, 17, 31; 1903.

[5]) Willstätter und Csányi, H. 117, 172; 1921.

[6]) E. Fischer, Chem. Ber. 26, 2400; 1893.

[7]) van Ekenstein, Rec. d. trav. Pays-Bas 13, 185; 1894.

[8]) A. E. Armstrong und Glover, Proc. Roy. Soc. B. 80, 312; 1908.

Zahlreiche andere Alkylglukoside sind beschrieben.

Allylglukosid und Bromallylglukosid werden durch Emulsin hydrolysiert (E. Fischer, H. 108).

Anhydro-methyl-glukosid $CH_3 \cdot OC_6H_9O_4$, von E. Fischer und Zach[1]) dargestellt, wird nach Angabe dieser Forscher von Emulsin nicht gespalten.

Vorkommen: Die Alkyl-β-Glukosidase ist ein Bestandteil des Mandel-Emulsins, und zwar aus bitteren und süssen Mandeln. Über die weitere Verbreitung fehlen noch genauere Angaben. Bezgl. der Spezifität dieses Enzyms hat I. Bolin[2]) im hiesigen Laboratorium einige orientierende Versuche ausgeführt; ein Präparat aus den Blättern von Salix caprea erwies sich in einem Versuchsjahr aktiv gegen Salicin, aber nicht gegen β-Methylglukosid. Aus den viel eingehenderen quantitativen Versuchen von Willstätter kann auf die Verschiedenheit des β-Methylglukosides von der „Prunase" geschlossen werden.

Präparate: Über die Emulsinpräparate von Willstätter u. Csányi sowie von Helferich, welche auch an Methyl-β-Glukosid geprüft worden sind, siehe S. 226 u. ff.

Wirkungsbedingungen.

Optimale Azidität: Aus Messungen von Willstätter u. Csányi ergibt sich, dass die enzymatische Spaltung von Methyl-β-Glukosid bei pH = 3 nicht, und bei pH = 7 fast nicht vor sich geht. In einer Versuchsreihe haben diese Forscher 40 mg eines Emulsinpräparates 6 Stunden bei 30° bei Gegenwart von Azetatpuffer zur Wirkung gebracht und dabei folgende Spaltungsgrade erhalten:

pH	4,1	4,4	5,0	5,3	5,6
% Spaltung	53,6	58,1	60,4	57,3	53,6.

Als pH-Optimum geben Willstätter und Csány 4,7—5,1 an.

Paralysatoren: Sowohl Toluol als Chloroform lassen die Wirksamkeit ungeändert; β-Glukosidase ist gegen aliphatische Alkohole bedeutend resistenter als das α-Enzym.

Kinetik.

Der zeitliche Verlauf der Hydrolyse in Methylalkohol und Glukose ist unter Einhaltung optimaler Aziditätsbedingungen von Willstätter und Csányi (l. c.) untersucht worden:

0,8% Glukosidlösung; 100 mg Emulsin; pH = 4,4; Temperatur 30°.

Stunden	% gespalten	$k \cdot 10^4$
2	7,1	370
16	48,35	410
19	57,45	450
23	62,0	420
26	65,4	410
41	81,0	400
48	84,2	380

[1]) E. Fischer u. Zach, Chem. Ber. 45, 456; 1912.

[2]) I. Bolin, H. 87, 182; 1913.

Was den Einfluss der Enzymkonzentration betrifft, so geben die genannten Autoren 2 Versuchspaare an; nach diesen ist für eine etwa 40%ige Spaltung das

Produkt aus Zeit × Emulsinmenge = Konst.

Versuch	mg Emulsin	Stunden	% gespalten
1a	10	15	42,65
1b	50	3	43,35
2a	100	2	37,6
2b	200	1	37,5

Enzymatische Synthesen.

Die Kenntnis der synthetischen Wirkungen des Emulsins und den endgültigen Nachweis, dass eine Glukosidase das Gleichgewicht zwischen Methylalkohol (sowie seinen Homologen) und Glukose von beiden Seiten her einstellt, verdankt man E. Bourquelot und seinen Mitarbeitern, von denen hier besonders Hérissey und Bridel zu nennen sind.

Durch zahlreiche Experimente wurde gezeigt, dass es sich in jeder Hinsicht um echte Gleichgewichte handelt. Bourquelot and Bridel gingen z. B. von folgender Lösung aus:

β-Methylglukosid (entsprechend 2 g Glukose) . .	2,1555 g
Methylalkohol	10
Wasser	100
Emulsin in Pulverform	0,30

Die unmittelbar einsetzende Hydrolyse kam zum Stehen, als die Anfangsdrehung — 1° 26′ (l = 2) in + 1° 20′ übergegangen war, wobei aus 1,6934 g Methylglukosid 1,5712 g Glukose gebildet worden waren. Weiterer Emulsinzusatz änderte das Gleichgewicht nicht.

Ein Parallelversuch zum oben genannten wurde mit einer Lösung begonnen, welche 2 g Glukose im entsprechenden Alkohol-Wassergemisch enthielt; er kam von der Anfangsdrehung 2° auf + 1° 12′.

Entfernte man einen Teil der Glukose aus der Lösung, was durch Zusatz von Hefe geschehen konnte, so schritt die Hydrolyse bis zum Eintritt eines neuen Gleichgewichtes weiter.

Ein weiterer Versuch ist in folgender Tabelle zusammengestellt; er bezieht sich auf eine Lösung, welche 30,2 Vol.-% Methylalkohol enthält.

Von beiden Seiten her wird also die gleiche Enddrehung (Mittel 11′) erreicht.

Den Einfluss der Alkoholkonzentration sehen wir aus der Kurve, welche bereits im I. Teil (S. 219, Fig. 29) dargestellt worden ist. Sie zeigt, dass bei

hohem Alkoholgehalt (z. B. 95 %) der grösste Teil der Glukose im Gleichgewicht in Glukosid verwandelt ist.

Synthese.		Hydrolyse.	
1 g Glukose in 100 ccm		1,077 g Methylglukosid in 100 ccm	
Versuchstage	Drehung (2 dm)	Versuchstage	Drehung (2 dm)
0	+ 64′	0	— 42′
1	+ 58′	1	— 36′
2	+ 48′	2	— 26′
4	+ 40′	4	— 18′
8	+ 28′	8	— 6′
13	+ 16′	13	+ 6′
18	+ 12′	18	+ 10′

Sehr interessant sind Bourquelots und Bridels[1]) Versuche über die gleichzeitige Einwirkung von α- und β-Glukosidase auf wässrig-alkoholische Lösungen von Glukose. Untersucht man unter gewissen Konzentrationsbedingungen (1 g Glukose, 20 g Äthylalkohol in 100 ccm wässeriger Lösung) die Gleichgewichte zwischen Glukosid und Glukose für jede der beiden Glukosidasen getrennt, so erhält man:

für α-Äthylglukosid $32{,}6\ /67{,}4\ = k_a$

„ β-Äthylglukosid $23{,}30/76{,}61 = k_b$

und zwar sind die Werte beider Konstanten in weiten Grenzen unabhängig von der absoluten Konzentration der Glukose[2]).

Bezeichnet man für ein gegebenes Lösungsvolum (etwa 100 ccm) mit

q die Gesamt-Menge Glukose (frei und gebunden)

x die Menge von α-Äthylglukosid }
y „ „ „ β-Äthylglukosid } im Gleichgewicht,
z „ „ der freien Glukose }

so gilt die Gleichung: $x + y + z = q$.

Ferner gilt, wenn k_a und k_b wie oben Gleichgewichtskonstanten bezeichnen, allgemein

für α-Äthylglukosid $x = k_a \cdot z$

„ β-Äthylglukosid $y = k_b \cdot z$

somit

$$k_a z + k_b z + z = q \quad \text{und also} \quad z = \frac{q}{k_a + k_b + 1}.$$

Die im Gleichgewicht frei gebliebene Glukosemenge ist also nach gleichzeitiger Einwirkung der beiden Glukosidasen gleich der Menge der angewandten Glukose, dividiert durch $1 + k_a + k_b$.

[1]) Bourquelot und Bridel, Jl de Pharm. et de Chim. (7) 9, 104, 155, 230; 1914. — 10, 361, 393; 1914.

[2]) Man könnte daran denken, aus den beiden obigen k-Werten die relativen Mengen α- und β-Glukose in der Lösung zu berechnen, was aber durch die ev. Anwesenheit einer weiteren Form (Lowry, Jl Chem. Soc. 83, 1314; 1903) erschwert wird.

Zur Prüfung dieser Formel wurde u. a. folgende Mischung hergestellt, welche bei Zimmertemperatur (15°—19°) das Gleichgewicht erreichte.

	Glukose	1,9935	g
	Äthylalkohol	20,0	g
	Wasser	50	ccm
Dazu:	Mazeration (1:10) getrockneter Unterhefe	20	ccm
	Emulsin[1])	0,3	g
	Wasser zu	100	ccm

Für diese Lösung berechnet sich der Wert z:

$$z = \frac{1,9935 \text{ g}}{\frac{32,6}{67,4} + \frac{23,39}{76,61} + 1} = 1,1143 \text{ g}.$$

Folgende Drehungen wurden erhalten:

Versuchsdauer Tage	Drehung	Freie Glukose
0 (Beginn)	2° 6′	1,9935 g
2	2° 22′	—
8	2° 56′	1,240 „
16	2° 46′	1,134 „
28	2° 44′	1,1164 „
36	2° 44′	1,1164 „

Es zeigt sich also zwischen dem für freie Glukose berechneten Werte 1,1143 und dem hier gefundenen, 1,1164 vollständige Übereinstimmung.

Berechnet man die Werte für x und y, so findet man

für x: 0,5388 entsprechend 0,622 g α-Äthylglukosid
„ y: 0,340 „ 0,393 g β-Äthylglukosid.

Für die Mischung 1,1143 g Glukose + 0,622 g α-Äthylglukosid + 0,393 g βAthylglukosid

Drehung berechnet 2° 45′
„ beobachtet 2° 44′.

Die Reihe der schon 1914 von Bourquelot und seiner Schule synthetisierten Alkohole findet man im I. Teil S. 223. Die Gleichgewichtskonstanten scheinen sich für Methyl-Äthyl- und Propylalkohol nicht stark zu unterscheiden.

Einfluss der Substitution im Glukoserest auf die Spaltung.

Wie schon im Teil I (S. 247) erwähnt wurde, hat E. Fischer[2]) bemerkenswerte Tatsachen gefunden, welche zeigen, dass Substitution am Glukoserest die enzymatische Spaltbarkeit von β-Methylglukosiden stark beein-

[1]) Die beiden Enzyme wirken nicht unter ihrem etwas verschiedenen (pH = 6,4 bzw. 5,0) Aziditätsoptimum; immerhin dürften beide nicht allzu weit von diesem Optimum entfernt gewesen sein.

[2]) E. Fischer, H. 107, 176; 1919.

flussen; so wird aus β-Methylglukosid-6-bromhydrin der Methylalkohol durch Emulsin nicht freigemacht, während bei β-Methyl-d-iso-rhamnosid die entsprechende Spaltung ebenso unbehindert vor sich geht, wie beim β-Methylglukosid selbst.

In diesem Zusammenhang mag auch noch erwähnt werden, dass nach Fischer[1]) β Methyl-Xylosid von Emulsin ebensowenig angegriffen wird wie die entsprechende α-Verbindung. (Vgl. auch Kap. 9.)

Temperatureinfluss.

Nach einigen Angaben (ohne Zahlenbelegen) von H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton (l. c.) behält Mandel-Emulsin auch nach mehrstündigem Erhitzen der Lösung auf 55° seine Wirkung auf Methylglukosid bei: als Zerstörungstemperatur wird 59° angegeben.

In alkoholischer Lösung, in welcher das Enzym nicht ausgefällt ist, tritt nach Bourquelot u. Bridel[2]), die Inaktivierung bei um so niedrigerer Temperatur ein, je höher die Alkoholkonzentration ist. Ausgefälltes Enzym (60—95% Alkohol) ist im allgemeinen widerstandsfähiger gegen höhere Temperaturen[3]).

Als sekundären Alkohol hat Bourquelot den Isopropylalkohol in den Kreis seiner Untersuchungen gezogen und ein β-Glukosid erhalten (l. c. 1915). Auch was die β-Alkyl-Glukoside mehrwertiger Alkohole betrifft, so verdankt man Bourquelot[4]) eine eingehende Untersuchung.

Van 't Hoff[5]) hat das enzymatische Gleichgewicht des von Fischer[6]) als Sirup dargestellten Glyceringlukosides, vermutlich des Monoglukosides, untersucht.

„Versuche mit dem Molekularverhältnis zwischen Glukose und Glyzerin 1:4 wurden mit steigenden Wassermengen versetzt; ist dieselbe (im ganzen) in Molekülen b, und der umgewandelte Glukosebruchteil a, so entspricht:

$$K = \frac{\text{Glukosid} \times \text{Wasser}}{\text{Glukose} \times \text{Glyzerin}} = \frac{a\,(b + a)}{(1-a)\,(4-a)}.$$

Glukosidbildung fand noch statt für b = 15 und a = 0,38, was für obigen Wert 2,6 bringt, so dass jedenfalls K grösser ist als 1. Im molekularen Verhältnis würden also Glyzerin und Glukose bis etwa 70% sich umwandeln können."

Eingehender hat Bourquelot die β-Glukosidbildung des Glyzerins (l. c. S. 371) studiert, und ist dabei zu zwei Monoglukosiden nämlich einem primären und einem sekundären gelangt (l. c. S. 376).

Von übrigen von diesem Forscher erhaltenen Glukosiden sei das Glykolglukosid (mit Bridel, C. r. 158) erwähnt.

[1]) E. Fischer, Chem. Ber. 45, 3761; 1912. — H. 26. 68; 1898. — Siehe hierzu die Bemerkung H. 107, S. 191.

[2]) Bourquelot u. Bridel, C. r. 155, 319; 1912. — Jl Pharm. et Chim. (7) 7, 27; 1913.

[3]) Dass ausgefällte Glukosidase überhaupt noch wirksam ist betont besonders Bayliss (Jl of Physiol. 50, 85; 1915).

[4]) Bourquelot, Ann. de Chim. et Phyd. (9) 4, 310; 1915. — Siehe auch Bourquelot Bridel u. Aubry, C. r. 160, 823; 1915.

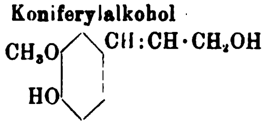
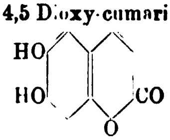
[5]) van 'tHoff, Sitz. Ber. Preuss. Akad. 48, 963; 1910. — Siehe hierzu auch Versuche von Bayliss, Jl of Physiol. 43—46; 1912—1913, die aber Bourquelot (Ann. de Chim. et Phys. (9) 4 nicht bestätigen konnte.

[6]) Fischer u. Beensch, Chem. Ber. 27, 2478; 1894.

C. β-Glukosidasen von Phenolen und CN-freien Phenolderivaten (Phenyl-β-Glukosidasen).

1. Substrate.

Ebensowenig wie die Stellung der Phenyl-β-Glukosidasen zu den Alkyl-β-Glukosidasen geklärt ist, kann die Einheitlichkeit der erstgenannten Gruppe als sichergestellt angesehen werden. Diejenigen Substrate, an welchen die enzymatische Spaltbarkeit besonders geprüft ist, können nach den aromatischen Komponenten etwa so gruppiert werden, wie in der ersten Spalte der folgenden Tabelle geschehen ist. Daneben ist als Beispiel eine typische Glukosidkomponente und das entsprechende Glukosid nebst dessen Vorkommen angegeben.

Gruppe	Aromat. Teil	Glukosid	Vorkommen
I. Phenole	Phenol	Phenylglukosid	Synth. Fischer und Armstrong, Chem. Ber. 34
	Hydrochinon	Arbutin	Ericaceen, Blätter
II. Aromat. Alkohole	Benzylalkohol	Benzylglukosid	Synth. Fischer, Chem. Ber. 26 u. 27. Fischer und Helferich, Lieb. Ann. 383
	Salizylalkohol $HO \cdot C_6H_4 \cdot CH_2OH$	Salicin	Salix und Populus, Blätter
	Koniferylalkohol 	Koniferin	Kambialsaft der Koniferen
III. Phenolaldehyd	$HO \cdot C_6H_4 \cdot CHO$	Spiraeїn	Spiraea
IV. Phenolsäuren u. deren Ester	$CH_3CO_2C_6H_4 \cdot OH$	Betulin, Gaultherin	Betula lenta, Rinde u. a.
	4,5 Dioxy-cumarin 	Äskulin	Äskulus, Rinde

Hieran reihen sich die Enzyme spezieller Glukoside, wie der Rubierythrinsäure, der Anthozyane, Saponine, des Indikans.

Bekanntlich haben mehrere Enzymchemiker die Existenz zahlreicher, auf spezielle Glukoside spezifisch wirkender Enzyme angenommen. So hat Sigmund geglaubt, aus seinen Versuchen den Schluss ziehen zu können, dass Salicin durch eine spezifische Salikase gespalten wird, ebenso Arbutin durch eine Arbutase, Äskulin durch eine Äskulase, Populin durch eine Populase, Gaultherin bzw. Betulin durch eine Gaultherase bzw. Betu-

lase, Phlorizin durch eine Phlorizinase. Weiter findet man in der Literatur die Enzym-Namen Elaterase, Primiverase u. a.

Bezüglich dieser hypothetischen Enzyme in Pflanzen mag folgender Hinweis auf die früheren Arbeiten genügen:

Enzym	Vorkommen	Verfasser	Schriftstelle
Salikase	Salix und Populus	Sigmund	Wien. Sitz.-Ber. I, 117, 1218; 1908 Monatsh. f. Chem. 30, 77; 1909
	Salix und Populus	Weewers	Rec. Trav. bot. Néerl. 7, 1; 1910
		Bolin	H. 87, 182; 1913
	Verschiedene Pflanzen	H. E Armstrong, E. F. Armstrong und Horton	Proc. Roy. Soc. B. 85, 363; 1912
	Kürbis	Krauch	Landw. Versuchsst. 23, 77
Arbutase	Calluna- und Vaccinium-Arten	Sigmund	Wien. Sitz.-Ber. I, 117, 1218; 1908
		Fichtenholz	Soc. Biol. 66, 830; 1909 Jl de Pharm. et de Chim. 30, 199; 1909
	Grevillea robusta Birnbaumblätter	Bourquelot und Fichtenholz	C. r. 151, 81; 1910 Jl de Pharm. et de Chim. (7) 2, 97; 1910. — 4, 145, 441; 1911. — 5, 425; 1912
		Bourquelot und Hérissey	C. r. 146, 764; 1908 Jl de Pharm. et de Chim. 27, 421; 1908
Populase	Salix	Sigmund	l. c.
	Populus	Weewers	l. c.
	Aspergillus	Hérissey	Thèse, 1899
Betulase oder Gaultherase	Betula, Spiraea ulmaria, Gaultheria procumbens, Monotropa, Hypopitys, Polygala vulg. u. a.	Bourquelot[1]	Jl de Pharm. et de Chim. (6) 3, 577; 1896
	Betula	Schneegans und Gerock	Arch. de Pharm. 232, 437; 1894
		Beijerinck	Zentralbl. f. Bakt. II, 5, 425; 1899
Äskulase	Äskulus, Rinde und Samen	Sigmund	Monatsh. f. Chem. 31, 657; 1910
Primiverase	Primula officinalis u. andere Primulaceen	Goris u. Maseré	C. r. 149, 947; 1909
Elaterase (Existenz sehr fraglich)	Ecballium elaterium	Berg	Soc. Biol. 71, 74; 1911 C. r. 154, 370; 1912

[1]) Nach Bourquelot ist der Entdecker Procter.

Die Annahme einer Verschiedenheit dieser Enzyme vom „Emulsin" der Mandeln hat insofern eine gewisse Berechtigung gehabt, als das Mandelemulsin Enzyme enthält, welche nicht auf Phenyl-β-Glukoside wirken, z. B. Amygdalase, so dass man also sehr wohl durch ein Enzympräparat, welches verhältnismässig reich an Amygdalase ist, aus Amygdalin Glukose abspalten kann, während eine Wirkung auf Salicin nicht erkennbar ist.

Es ist nicht unwahrscheinlich, dass dasjenige Enzym, welches Glukose von der primären Alkoholgruppe eines Phenolalkohols abtrennt, den eigentlichen Alkyl-β-Glukosidasen nahe steht und verschieden ist von demjenigen Enzym, welches Phenylglukoside, wie Arbutin, spaltet.

Auch das Enzym, welches die Glukosidbindung der Nitrilglukoside angreift, die sog. Prunase, soll einstweilen als besonderes Enzym behandelt werden.

Spezifität in dem Sinne aber, dass jedem β-Glukosid sein eigenes Enzym zukommt und somit den Substraten Salicin, Arbutin, Äskulin je ein besonderes Enzym entspricht, braucht auf Grund der vorliegenden Tatsachen noch nicht angenommen zu werden. Verf. ist mit der Prüfung dieser Frage beschäftigt und möchte daher noch keine endgültige Entscheidung treffen, glaubt aber von einer Phenyl-β-Glukosidase sprechen zu können im selben Sinne wie von einer Esterase oder Ereptase.

Als Substrat zur Untersuchung der Phenyl-β-Glukosidase scheint das neuerdings wieder von Helferich[1]) verwendete Salicin recht geeignet. Erweisen sich im Lauf der Zeit die Phenyl-β-Glukosidasen wirklich als ein einheitliches Enzym, so kann vielleicht später die Bezeichnung Salikase statt Phenyl-β-Glukosidase (der Kürze wegen) gebraucht werden.

Emulsin spaltet auch Chlor- und Bromderivate des Salicins.

Eine eingehende Untersuchung über den Einfluss der Struktur auf die Wirkung des „Emulsins" verdankt man E. Fischer und seinen Mitarbeitern, besonders Helferich. Die älteren Ergebnisse, bei welchen die Azidität der Lösungen oft von der für Emulsin optimalen weit entfernt war, bedürfen, wie Fischer bemerkt, einer Nachprüfung. Bei Fischers Versuchen hat sich schliesslich gezeigt, dass bei Einhaltung geeigneter pH-Werte die meisten β-Glukoside durch Emulsin gespalten werden.

Besondere Verhältnisse liegen bei den Glukosidosäuren vor (H. 107, S. 181): Die freien Säuren werden offenbar nur langsam gespalten, die Salze schneller und ohne Einfluss der Kationen. Von den Derivaten sind die Ester, Amide und Nitrile am leichtesten hydrolysierbar; für die Glukosidoglykolsäure ist im I. Teil dieses Buches, S. 246 eine kleine Tabelle über beobachtete Spaltungsgrade angegeben.

„Die Derivate der Glukosido-β-Oxyisobuttersäure sind auffallend resistent; denn die Salze zeigen kaum eine Spaltung und auch bei Ester, Amid und

[1]) Helferich, H. 117, 159; 1921.

Nitril (Linamarin) geht die Hydrolyse sehr langsam vonstatten. (Bei dem Nitril war diese Erscheinung schon von Armstrong und Horton beschrieben). Offenbar hängt dies zusammen mit der Bindung des Zuckerrestes an das tertiäre Kohlenstoffatom. Auch bei dem Amylenhydratglukosid, wo ebenfalls der Zuckerrest an eine tertiäre Alkoholgruppe gebunden ist, findet die Hydrolyse durch Emulsin verhältnismässig langsam statt."

Bei der Glukosidomandelsäure besteht ein Unterschied zwischen den Derivaten der d- und l-Mandelsäure. Denn die Salze und das Amid der d-Mandelsäure werden nicht angegriffen. Dagegen werden die Salze der l-Verbindung offenbar gespalten, wie die Versuche mit dem Gemisch der beiden Glukosidomandelsäuren zeigen.

„Noch merkwürdiger ist das Verhalten der Methylester. Auch hier werden die Derivate beider Mandelsäuren durch Emulsin gespalten." Die Bildung von d-Mandelmethylester aus dem Glukosido-dMandelester ist durch enzymatische Hydrolyse experimentell festgestellt; eine tautomere Form ohne asymmetrisches Kohlenstoffatom kann also hier nicht entstehen. Wie Fischer hervorhebt, verdient also der Fall des Glukosido-d-Mandelsäuremethylesters bei allgemeinen stereochemischen Betrachtungen über Zusammenhang von Enzymwirkung und Konfiguration eine besondere Berücksichtigung[1]).

Bereits im I. Teil ist auf die auffallende Tatsache aufmerksam gemacht worden, dass β-Methylglukosid und β-Methyl-d-iso-rhamnosid von Emulsin gespalten werden, während β-Methylglukosid-6-bromhydrin nicht spaltbar ist; wie die folgende schematische Formel zeigt, steht das Bromhydrin in der Mitte zwischen den beiden anderen Glukosiden.

$R \cdot OCH_3$	$R \cdot OCH_3$	$R \cdot OCH_3$
•	•	•
CH_2OH	CH_2Br	CH_3
β-Methylglukosid	β-Methylglukosid-6-bromhydrin	β-Methyl-d-iso-rhamnosid
spaltbar	nicht spaltbar	spaltbar

Auf das Verhalten der beiden Xyloside kommen wir im Kapitel 9 noch zurück.

Einteilung.

Spaltungen von Phenyl-β-Glukosiden sind auch in tierischen Organen beobachtet worden. Wir wollen zunächst die hierüber vorliegenden Angaben zusammenfassen, bevor wir die weit wichtigeren pflanzlichen Enzyme behandeln.

2. Tierische Phenyl-β-Glukosidasen.

Genauere Angaben über diese Enzyme oder ihre Wirkungsart liegen nicht vor, sondern meist nur Beobachtungen über ihr Vorkommen, also An-

[1]) Eine ausgeprägt spezifische Auswahlfähigkeit zwischen zwei Antipoden habe Karrer, Nägeli und Smirnoff neuerdings beim Umsatz von dl-Azetobromglukose mit dem Silbersalz der dl-Mandelsäure beobachtet. (Helv. 5, 141; 1922).

Tiere u. spaltende Organe	Gespalt. Glukosid	Bemerkung	Beobachter	Schriftstelle
Kaninchen, Katze, Hund; Leber und Niere	Salicin, Arbutin, Helicin	Negative Resultate mit Organextrakten	Grisson	Diss. Rostock, 1887; Malys Jahresb. 17
Pferd, Kaninchen; Leber und Niere	Salicin	Wirksam ist die wässerige Enzymlösung, nicht die alkohol. Fällung	Gérard	Soc. Biol. 53, 99; 1901
Nur in Niere von Pferd, nicht Hund, Kaninchen, Rind, Schaf	Phlorizin		Charlier, i. Anschluss an Arbeiten von Minkowski	Soc. Biol. 53, 494; 1901
Rinds-, Hasen-, Hunde- und Pferdeleber	Arbutin	Nur kolorim qualitat. Prüfung auf Glukose (unsicher)	Gonnermann	Pflüg. Arch. 113, 168; 1906
Leber und Niere von Pflanzenfressern (Kaninchen, Hammel, Rind, Schwein)	Salicin	Bei Fleischfressern (auch Mensch) mit Leber und Niere höchstens schwache Wirkung[1])	K. Omi	Biochem. Zs 10, 258; 1908
Kaninchen und Hund	Salicin	Ausscheidung v. Ätherschwefelsäure nach Eingabe von Salicin	Kusumoto	Biochem. Zs 10, 264; 1908
Menschl. Plazenta; Leber und Niere v. Kaninchen	Salicin, Arbutin, Helicin		Higuchi	Biochem. Zs 17, 21; 1909
Leber und Niere v. Katze, Schwein, Kaninchen, nicht Mensch	Salicin, Arbutin		R. Bass	Zs f. exp. Path. 10, 120; 1911
Stierhoden	Salicin	Schwache Wirkung	Mihara	H. 75, 443; 1911
Hirn von Mensch, Kaninchen, Meerschweinchen	Arbutin		Leo Hess	Wien. klin. Wochenschr. 24, 1009, 1911
Darm höherer Tiere	Salicin (?)	Bei vielen Tieren erfolgt die Spaltung im Darm durch Bakterien	Thomas u. Frouin	Ann. Inst. Pasteur, 23, 261; 1909
		Avertebraten.		
Krebse	Salicin		Kobert	Pflügers Arch. 99, 116; 1903
	Populin, Phlorizin		Giaja und Gompel	Soc. Biol. 62, 1197; 1907
Zahlreiche Käfer, Puppen, Kanthariden, Würmer usw.	Salicin, Arbutin		Kobert	l. c.

[1]) In der Leber von Hunden wurde nach Exstirpation des Pankreas eine Salicinspaltung beobachtet, die sich bei normalen Hunden nicht zeigte.

gaben, dass gewisse β-Glukoside von gewissen Organen gespalten worden sind[1]). Der Übersichtlichkeit wegen seien deshalb die Ergebnisse, zu welchen die verschiedenen Beobachter gekommen sind, tabellarisch zusammengefasst. Dazu muss aber bemerkt werden, dass das den Angaben zugrunde liegende Tatsachenmaterial manchmal recht dürftig und unsicher erscheint. Negative Resultate können natürlich auch oft durch ungeeignete Azidität der Lösung veranlasst sein.

Über die Wirkungsbedingungen der tierischen β-Glukosidasen ist, wie erwähnt, nichts bekannt. Es bleibt zu untersuchen, ob sich nicht die Aziditätsbedingungen dieser tierischen β-Glukosidasen von denen der pflanzlichen in ähnlicher Weise unterscheiden, wie dies bei den Saccharasen nachgewiesen ist.

3. Pflanzliche Phenyl-β-Glukosidasen.

Vorkommen.

Zunächst sei auf die S. 211 gemachten Angaben über das Vorkommen von „Emulsin" verwiesen. Da eventuelle Besonderheiten einzelner Enzyme dieser Gruppe noch nicht festgestellt sind, kann auch über Vorkommen spezieller Phenylglukosidasen einstweilen nichts gesagt werden; im allgemeinen wird man besondere Enzyme in den gleichen Pflanzenorganen suchen, welche die entsprechenden Glukoside in grösserer Menge enthalten.

Malzextrakt spaltet nach van Laer[2]) Salicin nicht.

Die Glukosidspaltung durch Kryptogamen wurde von Bourquelot[3]) nachgewiesen, und zwar greifen sowohl höhere als niedere Pilze, Hefen und Bakterien Phenyl-β-Glukoside an. Hérissey fand eine Glukosidase in Moosen[4]) und Flechten[5]); ähnliches fand Heut[6]).

Bourquelot[7]) gibt ein Verzeichnis derjenigen höheren Pilze, bei welchen er Spaltung von Salicin und Koniferin (und Amygdalin) nachweisen konnte; darunter befinden sich Hydnum cirrhatum, Fuligo varians, Auricularia sambucina, Polyporus fomentarius; für die beiden letzteren werden die Versuche ausführlicher beschrieben. Ausser einer Beobachtung an Agaricus campestris von Kobert (Lehrb. d. Intox.) ist noch eine Untersuchung von Zellner[8]) zu erwähnen, welcher Spaltung von Salicin und Koniferin, nicht von Phlorizin, durch Holzpilze fand.

[1]) Es ist seit langem bekannt, dass Säugetiere nach Eingabe von Salicin Salicylsäure im Harn ausscheiden, welche als Oxydationsprodukt des Salicylalkohols angesehen wird.

[2]) van Laer, Soc. Biol. 84, 471; 1921.

[3]) Bourquelot, Soc. Biol. 45, 653, 804; 1893. — Bull. Soc. Mycol. France 9, 189, 230; 1893. — 10, 49; 1894. — 11, 235; 1895.

[4]) Hérissey, Soc. Biol. 50, 532; 1898.

[5]) Hérissey, Bull. Soc. Mycol. France 15, 44; 1899.

[6]) Heut, Arch. d. Pharm. 239, 581; 1901.

[7]) Bourquelot, C. r. 117, 383; 1893.

[8]) Zellner, Wien. Sitz.-Ber. IIb, 118, 489; 1907.

Auch bezüglich des Vorkommens in niederen Pilzen, besonders Schimmelpilzen, stammen die ersten gründlichen Untersuchungen von Bourquelot und Hérissey[1]), Behrens[2]) (Botrytis vulg., Monilia fructigena u. a.) und Klebs[3]). Ein biologisch reineres Enzympräparat gewinnt man nach Pottevin aus Aspergillus niger; das Aspergillus-Emulsin spaltet nämlich nur β-Glukoside, keine β-Galaktoside und keinen Milchzucker (vgl. S. 214).

Helicin wird nach Schäffer (Diss. Erlangen 1901) durch Mucoreen zerlegt. Salicinspaltung durch Ober- und Unter-Hefen wiesen Henry und Auld[4]), Bokorny sowie besonders Neuberg und Färber nach (vgl. S. 211 u. 241).

Besondere Aufmerksamkeit verdient die enzymatische Spaltung des Lignins wegen seiner Beziehung zum Koniferylalkohol (Peter Klason).

Unter den zahlreichen Angaben über Hydrolyse von Glukosiden durch Bakterien seien die von Gonnermann[5]) (Darmbakterien) mit Salicin und Arbutin angestellten erwähnt, diejenigen von van der Leck[6]) über Äskulinspaltung durch B. coli und besonders eine eingehende, von Twort[7]) an 49 Glukosiden angestellte Untersuchung mit Typhoid-Kolibakterien. Dabei wurden Salicin, Arbutin, Koniferin, Phlorizin und 23 andere angegriffen.

Darstellung (siehe auch S. 210).

Aus Pflaumenkernen. Helferich[8]) zerreibt 1,75 kg Kerne mit 4,4 l Wasser, verrührt zum Brei und lässt mit 290 ccm Toluol 3 Tage bei Zimmertemperatur stehen. Das Filtrat liefert bei der Alkoholfällung eine wirksamere Substanz, wenn es längere Zeit (etwa 9 Wochen) aufbewahrt war. Nach dieser Zeit wurde die filtrierte Flüssigkeit auf das Dreifache mit Wasser verdünnt, wobei eine starke Trübung auftrat, und durch ein Zsigmondyfilter von de Haen (Porenweite 1 oder 5) ultrafiltriert. Die klare Flüssigkeit wird dann in die 10fache Menge 95%igen Alkohols unter Umschütteln eingegossen. Nach 20 Stunden wurde vom Niederschlag dekantiert und dieser abgesaugt, unter möglichst beschränktem Luftzutritt mit absolutem Alkohol behandelt und im Exsikkator getrocknet. Das trockene, weisse Präparat war nur mehr mässig hygroskopisch. Ausbeute 28 g aus 3 l ursprünglicher Lösung (E I).

Reinigung (nach Helferich).

Präparat E I wurde in 185 ccm Wasser gelöst; beim Reiben kristallisiert viel Magnesiumphosphat aus. Nach zweistündigem Aufbewahren bei 0° wurde

---

[1]) Bourquelot und Hérissey, C. r. 121, 693; 1895.
[2]) Behrens, Zbt. Bakt. II, 4, 514; 1898.
[3]) Klebs, Jahrb. wiss. Bot. 32, 1; 1898.
[4]) Henry und Auld, Proc. Roy. Soc. B 76, 568; 1905.
[5]) Gonnermann, Pflügers Arch. 113, 168; 1906.
[6]) v. d. Leck, Zbt. Bakt. II, 17, 366; 1907.
[7]) Twort, Proc. Roy. Soc. B. 79, 329; 1907.
[8]) Helferich, H. 117, 159, und zwar 166; 1921.

der Niederschlag abgesaugt, das dunkel gefärbte Filtrat wurde mit 950 ccm Wasser verdünnt und diese Lösung in das 10fache Vol. 95%igen Alkohols gegossen. Ausbeute 12,1 g (Präp. E II). Durch 16stündige Dialyse (Fischblase) schritt die Reinigung fort; nach Entfernung eines geringen Niederschlags wurde unter 4 mm Druck konzentriert, filtriert und wieder mit der 10fachen Alkoholmenge gefällt. Die abzentrifugierte Fällung wurde nochmals in ähnlicher Weise umgefällt; Ausbeute: 0,4 g (Präp. E III). Durch eine weitere Umfällung ergab sich Präp. E IV[1]).

Die Wirksamkeit der Präparate zeigt sich in folgender Zusammenstellung:

Präparat	$k \cdot 10^4$	Zeitwert
E I	26,3	114
E II	53,6	56,1
E III	88,8	33,9
E IV	120,2	25,05
käufl. Emulsin Kahlbaum	8,82	341

Wirkungsbedingungen.

Als optimale Azidität für die Spaltung von β-Glukosiden wurde im I. Teil, S. 35 nach dem Befund von E. Fischer (H. 107) pH = 5 angegeben. E. Vulquin[2]) kam zu dem Ergebnis, dass für die Salicinspaltung ein höherer Säuregrad (pH = 4,4) günstig ist, als für die Hydrolyse des Amygdalins (pH = 5,4—5,7). Helferich stellte seine Versuche bei $h = 1{,}7 \cdot 10^{-5}$, also pH = 4,8 an (Puffer: Na-Azetat + Essigsäure).

Über spezifische Aktivatoren oder Paralysatoren ist wenig bekannt[4]). Ohne Einfluss sind Borsäure in kaltgesättigter Lösung (nach Agulhon (C. r. 148) und H_2S nach Fermi und Pernossi[3]).

Kinetik.

Grundlegende Versuche verdankt man Tammann[4]), welcher die Wirkung des Emulsins nicht nur auf Amygdalin, sondern auch auf Salicin, Arbutin und Koniferin untersucht hat.

Zersetzung von Salicin durch Emulsin.

t Stunden	a — x gef.	a — x ber.	k
1	87	88	0,061
3	68	67	0,057
5	42	52	0,075
8	35	35	0,056
12	24	21	0,052
26	9	3	0,040

[1]) Analysen von Emulsinpräparaten sind vor längerer Zeit von A. Schmitt und von Bull ausgeführt worden. Diese an Präparaten von geringer und unbekannter Wirksamkeit gewonnenen Zahlen sind ohne Wert.

[2]) Vulquin und Martini, Soc. Biol. 70, 270 u. 763; 1911.

[3]) Fermi und Pernossi, Zs f. Hyg. 18, 83; 1894.

[4]) Tammann, H. 16, 298; 1891. — Zs f. physik. Chem. 18, 435; 1895.

Der zeitliche Verlauf ergibt sich nach Tammanns Versuchen an Salicin als monomolekular.

Bemerkenswerte Fortschritte sind von Hudson und Paine[1]) erzielt worden, welche ebenfalls Salicin als Substrat verwendet haben.

Bei der Verfolgung der Reaktion auf polarimetrischem Wege haben sie die Tatsache berücksichtigt, dass bei der Spaltung β-Glukose entsteht und auch die Azidität der Lösung konstant zu halten versucht; die von ihnen angegebene optimale Azidität (0,005 Mol. HCl per Liter, also pH = 2,3) ist allerdings viel zu gross, in Wirklichkeit dürfte ein grosser Teil ihrer Salzsäure durch das Emulsin neutralisiert worden sein.

Minuten	Spez. Drehung (alkal. Lösung)	$k \cdot 10^4$	Temp. 30° Salicin: 5%
0	— 62,0°	—	
10	— 54,5	36	
20	— 48,7	33	
30	— 41,6	35,3	
35	— 39,5	33,9	
85	— 15,8	37,4	
145	+ 2,9	35	
∞	+ 32,2	—	

Die polarimetrischen Beobachtungen, welche Henri (Thèses, Paris 1903) an Salicin angestellt hat, sind wegen des störenden, nicht berücksichtigten Einflusses der Mutarotation der Glukose nicht verwertbar.

Herzog[2]) fand bei Versuchen mit 0,07 normaler Salicinlösung bei 25° Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung, welche mit der Zeit abnahmen:

Minuten	24	54	86	210	270	371
$k \cdot 10^4$	34,5	34,8	30,2	24,3	24,0	22,0.

Bezüglich der von Herzog aufgestellten Theorie sei auf die Originalarbeit verwiesen. Einige weitere Versuche teilt Visser[3]) mit.

In 50 ccm Lösung	Drehung °	Minuten	$k \cdot 10^4$	Zeitwert
—	— 2,51	0 (Anfang)	—	—
—	+ 1,33	∞ (Ende)	—	—
0,0709 g Emulsin Kahlbaum	— 1,98	120	5,38	560
„	— 1,49	240	5,59	539
„	— 1,02	360	5,92	508
0,1000 g E II	— 2,00	10	61,9	48,6
„	— 1,57	20	61,0	49,4
„	— 0,87	40	60,5	49,8
„	— 0,34	60	60,8	49,9
„	+ 0,22	90	59,9	50,3
„	+ 0,56	120	58,2	51,8
„	+ 0,80	150	57,3	52,5
„	+ 0,94	180	55,2	54,6

[1]) Hudson und Paine, Jl Amer. Chem. Soc. 31, 1242; 1909.

[2]) R. O. Herzog, K. Akad. v. Wetensch. te Amsterdam, 1903, 332. — Zs f. allgem. Phys. 4, 163; 1904.

[3]) Visser, Zs f. physik. Chem. 52, 257; 1905.

Helferich (l. c.) hat die Konstanz des Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung an käuflichem Emulsin (Kahlbaum) und an seinem Präparat E II (vgl. S. 227) geprüft und gibt ausserdem den „Zeitwert“ an, also die Anzahl Minuten, welche zur Spaltung der halben Substratmenge erforderlich ist, ausgerechnet durch den Quotienten log 2 : k. Polarimetrische Beobachtung im 2 dm-Rohr unter Berücksichtigung der Mutarotation. 2%ige Salicinlösung, gepuffert mit Azetat auf pH = 4,8. Temperatur 20°.

Die Drehung des Emulsins Kahlbaum ist mit —0,07°, die des Präparats E II mit —0,10° berücksichtigt.

Beim käuflichen Emulsin stiegen die k-Werte etwas, bei dem viel wirksameren Präparat E II fielen sie um rund 10%. Dass bei letzterem Versuch nicht etwa eine Zerstörung des Enzyms das Fallen von k veranlasst hat, wurde durch einen besonderen Versuch festgestellt.

Polarimetrische Versuche von Henri und Lalou (Soc. Biol. 55, 868; 1903) betreffen die gleichzeitige Spaltung des Amygdalins und Salicins.

t Minuten	2% Salicin	2,5% Amygdalin	2% Salicin + 2,5% Amygdalin	4% Salicin	1,25% Amygdalin
46	0,67	0,97	1,05	1,08	0,90
130	1,58	2,38	3,63	2,25	1,57
268	2,32	3,15	4,22	3,45	1,56
∞	3,15	3,17	6,32	6,30	1,59

Die Spaltung der Mischung erfolgt viel langsamer als die der beiden Bestandteile zusammen, was vielleicht auf Verbindungen zwischen Enzym und Substrat (möglicherweise auch auf methodischen Fehlern) beruht.

Einfluss der Enzymkonzentration. Es sei zunächst wieder eine Tabelle von Tammann (l. c. S. 430) angeführt, welche drei mit Mandelemulsin angestellte Versuchsreihen enthält. Sie gibt den Spaltungsgrad, welcher in einer 3,3%igen Salicinlösung bei 28° nach 12 Stunden eintrat.

mg Emulsin		10,0	5,0	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078
Gespaltenes Salicin in %	1.	91,3	80,0	59,3	34,7	20,8	10,2	5,8	2,8
	2.	91,3	80,5	60,0	35,5	21,1	9,2	4,8	2,3
	3.	77,6	70,5	55,4	36,8	18,8	10,7	4,5	2,9

Bei kleinen Spaltungsgraden zeigt sich eine befriedigende Proportionalität zwischen den Enzymmengen und den (nach der Reduktionsmethode mit Fehlingscher Lösung) ermittelten Spaltungsprozenten; bei den über 30% hydrolysierten Lösungen ist eine Proportionalität nicht mehr zu erwarten.

Helferich zieht aus Versuchen mit Emulsin Kahlbaum und mit eigenen Präparaten den Schluss, „dass der Reaktionskoeffizient mit der Enzymkonzentration zwar steigt, aber nicht proportional, sondern langsamer als diese“. Folgende Zahlen erhielt er mit seinem wirksamsten Präparat E III:

g Emulsin auf 100 ccm Salicinlösung	Drehung 1 dm-Rohr °	Minuten	Drehung des Emulsins 1 dm-Rohr	$k \cdot 10^4$	Zeitwert	$k \cdot 10^4$ / g Emulsin/100 ccm
0,0250	— 0,25	240	— 0,005	13,5	223	540
0,0500	— 0,31	120	— 0,01	24,9	121	498
0,1000	— 0,37	60	— 0,015	45,8	65,8	458
0,200·	— 0,44	30	— 0,065	88,8	33,9	444
0,4000	— 0,38	20	— 0,16	168,2	17,9	420,5

In der Figur 33 findet man diese Versuchsreihe mit den beiden anderen zusammengestellt. Man kann, wie mir scheint, aus den Kurven sowohl für Emulsin K (abgesehen vom Beginn der Kurve) als für Präparat E III eine angenäherte Proportionalität ersehen.

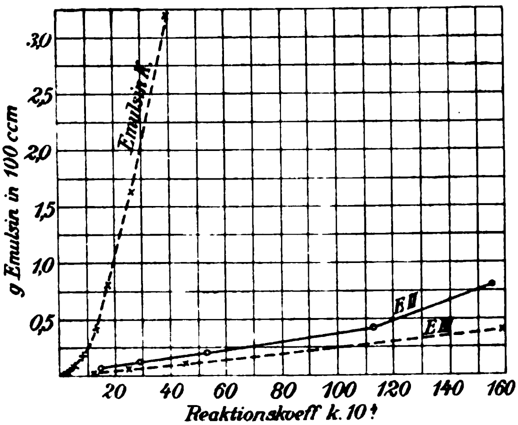


Fig. 38.

Helferich betont, „dass die Kurve sich der Geraden mehr nähert, also Enzymkonzentration und Reaktionskoeffizient einander näher proportional werden, je reiner und wirksamer die β-Glukosidase ist. Vielleicht ist dem angewandten Emulsin eine die Glukosidspaltung hemmende Verunreinigung beigemengt".

Für die grossen Mengen Enzympräparat K (bis 3 bzw. 6 g in 100 ccm) dürfte der Puffer (0,01 n-Azetat + 0,01 n-Essigsäure) zur Konstanthaltung der Azidität nicht ausgereicht haben, vielleicht auch nicht völlig für E II.

Über den Einfluss der Substratkonzentration (Salicin) hat Henri (l. c.) einige Zahlen angegeben, aus welchen hervorzugehen schien, dass der in gleichen Zeiten stattfindende prozentische Umsatz mit steigender Salicinkonzentration (0,035 norm. — 0,14 norm.) abnimmt.

Glukose bewirkt nach E. F. Armstrong[1]) eine beträchtliche Verzögerung der Emulsinwirkung auf β-Glukoside, Galaktose hemmt wenig und Fruktose gar nicht.

Über die verzögernde Wirkung der aromatischen Spaltprodukte liegen einige Versuche aus Bourquelots Laboratorium von Frl. Fichtenholz[2]) vor, welche allerdings einer Fortsetzung zur Klärung der Verhältnisse bedürfen. Hydrochinon hemmt die Hydrolyse des Arbutins stark, Tannin teilweise, Gallussäure hebt sie ganz auf. Im übrigen geht der Hemmungsgrad aus folgender Tabelle hervor:

[1]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B. 73, 516; 1904.
[2]) Fichtenholz, Jl de Pharm. et de Chim. 30, 199; 1909.

	Salicin	Gentiopikrin	Amygdalin	Koniferin	Aucubin
Hydrochinon	sehr gering	sehr gering	sehr gering	—	—
Gallussäure	mässig	mässig	mässig	mässig	fast vollständig
Tannin	mässig	mässig	mässig	mässig	mässig

Umkehrbarkeit der Glukosidspaltung. Wie bereits im I. Teil erwähnt wurde, ist es Bourquelot und seinen Mitarbeitern gelungen, eine grosse Reihe von β-Glukosiden, darunter auch viele der zyklischen Reihe, durch Emulsin zu synthetisieren. Die 1914 von Bourquelot[1]) nach Versuchen von Bridel und Hérissey angegebene Reihe sei hier nochmals angeführt:

Benzyl-Glukosid
Phenyläthyl-Glukosid
Cinnamyl-Glukosid
o-Oxybenzyl-Glukosid
o-Methoxybenzyl-Glukosid
m-Nitrobenzyl-Glukosid.
p-Methoxybenzyl-Glukosid
Naphthyl-Glukosid
Cyklohexanyl-Glukosid
o-Methylcyklohexanyl-Glukosid
Thymotinyl-Glukosid

Die Anzahl der synthetisierten Glukoside ist später noch vermehrt worden. Auch mit mehrwertigen Alkoholen der aromatischen Reihe wurden Synthesen erzielt, so mit o- und p-Phtalylalkohol[2]).

$$C_6H_4\begin{cases} CH_2 \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5 \\ CH_2 \cdot OH \end{cases}$$

Nach den Ergebnissen von Bourquelot kann es keinem Zweifel unterliegen, dass durch die β-Glukosidasen, und zwar sowohl durch die Alkyl- als die Arryl-Glukosidasen Gleichgewichte von beiden Seiten her eingestellt werden, und dass dabei übereinstimmende Gleichgewichtslagen erreicht werden. Es steht nur noch die experimentelle Prüfung der theoretischen Forderung aus, dass dieses enzymatische Gleichgewicht mit dem durch nicht enzymatische Katalysatoren eingestellten übereinstimmt.

Tammann[3]) hat bei der Spaltung von Arbutin und Koniferin gewisse von der Menge des angewandten Enzyms abhängige Endzustände (I. Teil, S. 217) erreicht, die aber keine Gleichgewichte sind.

Die Ermittlung der „natürlichen Gleichgewichtslage" des Systems

$$\text{Arryl} \cdot OH + \text{Glukose} \rightleftarrows \text{Arryl-Glukosid} + \text{Wasser}$$

hat van't Hoff[4]) kurze Zeit vor seinem Tod in Angriff genommen. Durch dilatometrische Messungen ergab sich, dass Salicin, Arbutin und Äskulin im Gleichgewicht fast vollständig in ihre Komponenten gespalten sind.

Die Bildung von festem Salicin aus den ebenfalls festen Spaltprodukten ist von einer Ausdehnung von 9,47 ccm pro g-Mol. begleitet. Bei einem Versuch kamen 0,8 g Salicin,

[1]) Bourquelot, Jl de Pharm. et de Chim. (7), 10, 361 u. 393.
[2]) Bourquelot und Ludwig, C. r. 149, 213; 1914.
[3]) Tammann, H. 16, 271; 1892.
[4]) van't Hoff, Sitzber. Preuss. Akad. d. Wiss. 1910. 963.

0,21 g Saligenin und 0,52 g Emulsin zur Anwendung. Der Anfangszustand des Dilatometers, 208 (bei 31°) fiel nach 4 Tagen auf 104. Die Kalibrierung (100 mm = 27,8 m³) liess für 0,8 g Salicin 95 erwarten, was durch Umwandlung der in der Füllflüssigkeit vorhandenen 0,12 g Salicin sich bis zum beobachteten Wert erhöhen konnte.

Über die natürlichen Gleichgewichte aromatischer Alkylglukoside liegen noch keine Messungen vor; wir hoffen diese Lücke bald ausfüllen zu können.

Einstweilen verdient hervorgehoben zu werden, dass die aromatischen Stoffe, mit welchen Bourquelot Synthesen erzielt hat, teils primäre Alkohole vom Typus Arr. $\cdot CH_2 \cdot OH$, teils alizyklische Alkohole sind. Für den dreiwertigen aliphatischen Alkohol Glyzerin hat van't Hoff, wie bereits S. 219 erwähnt, eine Gleichgewichts-Konstante

$$K = \frac{\text{Glukosid} \times \text{Wasser}}{\text{Glukose} \times \text{Alkohol}}$$

gefunden, welche grösser als 1 ist.

Ein interessantes biologisches Glukosidgleichgewicht haben Ciamician und Ravenna 1909 an Salicin beobachtet.

Temperatur[1]).

Stabilität des Enzyms. Aus den Arbeiten von Tammann (l. c.) ergibt sich für die Temperaturen über 60° eine verhältnismässig geringe Stabilität des Enzyms (wobei allerdings unsicher ist, ob bei den Versuchen optimale Azidität geherrscht hat), noch etwas geringer als bei Saccharase; bei 60° beträgt nämlich (siehe Teil I, S. 182) $k_e \cdot 10^3 = 13$.

Für den Temperaturkoeffizienten der Stabilität (also von k_e) berechnet sich A der Arrheniusschen Formel aus Tammanns Zahlen im Bereich 60°—75° A = 45000, also ein auffallend kleiner Wert.

Nach Armstrong und Horton (Proc. 80, 325) bleibt die Aktivität gegen Salicin und Amygdalin nach mehrstündigem Erhitzen des Mandelextraktes auf 55° noch erhalten, erst Erhitzen auf 59° zerstört.

Werden Mandeln mit Wasser bei 57° extrahiert, so war die Lösung, welche bei 38° gegen β-Methylglukosid, Salicin und Amygdalin aktiv war, nach Erhitzen auf 62° (Dauer?) unwirksam.

Helferich macht über die Stabilität seines gereinigten Präparates E II folgende Angaben:

24 stündiges Aufbewahren des trockenen Präparates E II unter abs. Alkohol, Azeton oder Äther beeinträchtigt die Wirksamkeit nicht. 10 Minuten Kochen mit Äthylalkohol setzt die Wirksamkeit erheblich herab.

Zeitwert vor dem Kochen: 56,1; Zeitwert nach dem Kochen: 88,7.

24 stündiges Aufbewahren des trockenen Präparates E II unter Methylalkohol bei Zimmertemperatur schwächt die Wirksamkeit erheblich.

[1]) Bezüglich Berechnung siehe Rahn, Biochem. Zs 72, 353; 1916. — Tammann und Svanberg, H. 111, 49; 1920.

Kurze Einwirkung von 0,1 n. Ammoniak schwächt die Glukosidase nicht.

Temperaturkoeffizient der Glukosidspaltung. Nach den Versuchen von Tammann ist der Temperaturkoeffizient k_{t+10}/k_t zwischen 15° und 25° ziemlich hoch, nämlich 2,4; die Konstante A der Temperaturformel (29) (Teil I, S. 172 u. 193) beträgt für die Salicinspaltung 15000.

Alizarin-Glukosidase. Erythrozym.

In der Wurzel von Rubia tinctorum kommt ein Enzym vor, welches nur auf das in der gleichen Pflanze enthaltene Glukosid, Rubian oder Ruberythrinsäure wirken soll, indem es aus demselben u. a. Glukose und Alizarin bildet. Die einzige Beschreibung stammt vom Entdecker dieses Enzyms, Schunck[1]), aus dem Jahr 1851. Dieser gibt an, dass die gleiche Wirkung auch durch Emulsin hervorgerufen werden kann. Aus dem wässrigen Extrakt soll es durch Bleiacetat und Quecksilberchlorid gefällt werden.

Es ist schwer, sich aus Schuncks Angaben eine Vorstellung über die Besonderheit des erwähnten Enzyms bzw. Enzymgemisches zu bilden. Enzyme, welche Anthrachinon-Glukoside angreifen, kommen übrigens ausser in Leguminosen auch in Flechten vor, und zwar hier, wie Verf. fand, begleitet von Oxydations- und Reduktionsenzymen.

Spaltung besonderer β-Glukoside.

Ausser den Glukosiden vom Typus des Salicins kennt man noch zahlreiche natürliche Glukoside, welche — wie die Anthocyane und Saponine — grosse, besondere Gruppen von Pflanzenstoffen ausmachen.

Wenn auch über ihre enzymatische Zerlegung und Bildung noch wenig bekannt ist, so sollen sie — schon weil sie ein interessantes Material der künftigen Enzymforschung bilden — auch hier nicht ganz übergangen werden, und man findet sie also in diesem Abschnitt mit einer Anzahl von künstlich dargestellten Glukosiden zusammengestellt.

Wir erwähnen also im folgenden die in Betracht kommenden wichtigsten Gruppen der

N-freien Glukoside, und dann der

N-haltigen Glukoside.

Die Systematik muss sich wegen Mangel an Angaben über die Enzyme auch hier wieder an die Substrate halten.

An dieser Stelle muss auch an die von E. Fischer verlangte Abgrenzung des Begriffes „Glukosid" erinnert werden: „Die frühere Gewohnheit" — schreibt Fischer[2]) — „alle natürlichen Derivate der Glukose, die keine blossen Kohlehydrate sind, Glukoside zu nennen, lässt sich nicht beibehalten. Ich verstehe unter Glukosiden nur die Stoffe, welche den Methyl- oder den Phenolglukosiden ähnlich konstituiert sind."

Dass die Spaltbarkeit der Glukoside durch ein bestimmtes Enzym oder Enzympräparat schon von kleinen Konstitutions- und Konfigurationsunter-

---

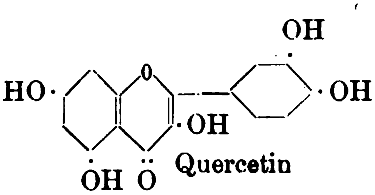
[1]) Schunck, Phil. Trans. 1851, 483 und 1853, 74. — Jl. prakt. Chemie 68, 222; 1854.

[2]) E. Fischer, Chem. Ber. 46, 3253; 1913. — Depside, S. 32.

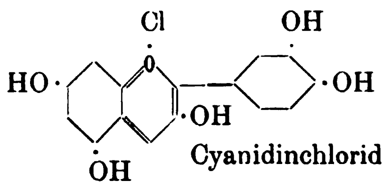
schieden stark verändert werden kann (es dürfte sich aber meistens um quantitative Änderungen handeln), ist im Anschluss an Fischer schon früher betont worden. Auch im aglukonischen Teil können Verlängerungen und Substitutionen in der Seitenkette oder am Phenylrest die Angreifbarkeit wesentlich beeinflussen. Man muss sich aber erinnern, dass dies doch keine reine Besonderheit der Enzymreaktionen ist, sondern dass grosse Variationen der Reaktionsfähigkeit auch bei der nicht enzymatisch katalytischen Spaltung von Homologen auftreten.

1. Flavonfarbstoffe und Anthocyane.

Wie durch die Untersuchungen von Willstätter[1]) bekannt geworden ist, stehen diese beiden Farbstoffgruppen miteinander in nächster Beziehung. Den gelben Farbstoffen liegt das Flavon oder Flavonol zugrunde, während die mit dem Zucker verbundenen Anteile der Anthocyane, die Anthocyanidine, Oxoniumbasen (Benzopyryliumbasen) sind, wie z. B. das Cyanidin.



Quercetin



Cyanidinchlorid

Anthocyane sind durchweg Glukoside, und zwar Mono- und Diglukoside; bei einigen kommt ausser Glukose noch Rhamnose vor, aus Idaein wird Galaktose gewonnen. Bis jetzt sind durch Willstätter und seine Mitarbeiter, besonders Everest, 8 Anthocyanidine bekannt geworden. Durch Eintritt der Hexosen an die verschiedenen HO-Gruppen leiten sich von ihnen zahlreiche Anthocyane ab.

Was die Flavonolfarbstoffe betrifft, so scheint ihre enzymatische Spaltung oft schwer durchführbar zu sein. Über Besonderheiten der diesen Glukosidgruppen entsprechenden Enzyme ist bis jetzt nichts Näheres bekannt.

2. Saponine.

Bekanntlich werden die Saponine durch verdünnte Mineralsäuren gespalten, und zwar in Produkte, welche in kaltem Wasser wenig oder gar nicht löslich und physiologisch sehr wirksam sind, Sapogenine, und in Hexosen, Pentosen oder ein Gemisch beider.

Bei wichtigen Angehörigen dieser Gruppe, wie beim Digitonin, ist die Glukosidnatur schon lange erkannt[2]). Dagegen finden sich über die enzymatische Spaltung nur vereinzelte Angaben. Viele Saponine, wie z. B. Cyklamin, widerstehen offenbar der Einwirkung des Emulsins.

Aber der Umstand, dass im Tierkörper eine Zerlegung stattfindet und ferner dass gewisse Mikroorganismen imstande sind, manche Saponine unter Verbrauch des Zuckers abzubauen, zeigt, dass Enzyme existieren müssen, durch welche sich eine Hydrolyse erzielen lässt.

---

[1]) Willstätter und Everest, Lieb. Ann. 401, 189; 1913. — Willstätter und Mitarbeiter, Lieb. Ann. 408; 1915.

[2]) Schmiedeberg, Arch. f. exp. Pathol. 3, 23; 1875. — Windaus, H. 121, 62; 1922.

3. Terpenalkohole.

Fischer und Raske[1]) haben das Borneol-β-Glukosid, Fischer und Bergmann[2]) das Menthol-β-Glukosid synthetisiert und die leichte Spaltbarkeit durch Emulsin nachgewiesen. Eine Reihe olefinischer, monocyklischer und bicyklischer Terpenalkohole sind von J. Hämäläinen[3]) mit Glukose kombiniert worden, so z. B. das Citronellol, Sabinol, Cyklohexanol und r-Borneol und auch für diese wurde die Spaltbarkeit durch eine Komponente des Mandelemulsins festgestellt. Alicyklische Reste verhindern also nicht die Wirksamkeit dieses Enzyms, das offenbar mit Phenyl-β-Glukosidase identisch ist.

Die Glukoside der Terpenalkohole treten wahrscheinlich als Zwischenprodukte im Stoffwechsel auf, wenn man die betreffenden Alkohole entweder an Tiere verfüttert oder als Arzneimittel beim Menschen verwendet. Sie sind im normalen Organismus unbeständig, indem sie zu entsprechenden gepaarten Glukuronsäuren oxydiert werden (Schmiedeberg und Meyer, Sundvik; E. Fischer). Bemerkenswert ist nach Hämäläinen die Analogie zwischen den isomeren Borneolglukosiden und den entsprechenden gepaarten Glukuronsäuren. Wenn man nämlich an Kaninchen, die vorher Emulsin subkutan bekommen haben, d- und l-Borneol verfüttert, so ist der Umfang der Glukuronsäurepaarung gesteigert.

4. Gepaarte Glukuronsäuren.

Den Nachweis, dass gepaarte Glukuronsäuren β-Glukoside sind, verdankt man Neuberg und Neimann[4]), welche die mit der natürlichen identische Phenolglukuronsäure synthetisch dargestellt haben. Neuberg hat auch ihre Konstitution und die Spaltbarkeit der Phenolglukuronsäure durch Emulsin dargetan.

$$C_6H_5O \cdot \overset{\displaystyle \lceil\!\!-\!\!-\!\!-\!\!-\!\!-\!\!-\!\!-\; O \;-\!\!-\!\!-\!\!-\!\!-\!\!-\!\!-\!\!\rceil}{CH \cdot CH(OH) \cdot CH(OH) \cdot CH} \cdot CH(OH) \cdot COOH$$

Phenol-Glukuronsäure.

Indessen scheinen nicht alle gepaarten Glukuronsäuren von Emulsin angegriffen zu werden. Positive Resultate haben Neuberg und Neimann[4]) mit Euxanthonsäure erhalten, Hämäläinen[5]) mit einigen Derivaten der Terpenglukoside, z. B. l-Kamphoglukuronsäure (während die d-Form nicht gespalten werden soll), und Hildebrandt[6]) mit der von ihm aus Syringin erhaltenen Syringaglukuronsäure. Mit Borneolglukuronsäure hat Hämäläinen keine Spaltung erhalten.

---

[1]) E. Fischer und Raske, Chem. Ber. 42, 1470; 1909.

[2]) E. Fischer und Bergmann, Chem. Ber. 50, 711; 1917.

[3]) J. Hämäläinen, Biochem. Zs 49, 398; 1913 und 50, 209; 1913.

[4]) Neuberg und Neimann, H. 44, 114; 1905.

[5]) Hämäläinen, Skand. Arch. Physiol. 23, 297; 1910.

[6]) Hildebrandt, Hofm. Beitr. 7, 438; 1905. Die aus Thymotinpiperidid dargestellte gep. Glukuronsäure wird durch Hefenenzym gespalten und enthält also ein α-Glukosid.

5. Glukosidosäuren.

Die meisten bisherigen Erfahrungen über die Spaltung der Glukosidosäuren sind den Arbeiten von E. Fischer und seiner Mitarbeiter[1]) zu entnehmen, und Fischer hat gerade den Unregelmässigkeiten, welche bei dieser Gruppe hinsichtlich des Verhaltens zu Emulsin beobachtet werden, seine Aufmerksamkeit gewidmet. (Siehe auch S. 245 u. 246.)

Während manche Derivate der Phenolcarbonsäuren, z. B. Glukovanillinsäure, Glukosyringasäure, Glukosidogallussäure von Emulsin gespalten werden, sind die freien Säuren, z. B. die Glukosidoglykolsäure als widerstandsfähig gegen das Enzym erkannt (zu hohe Azidität) im Gegensatz zu ihrem Amid, das leicht hydrolysiert wird[2]). Um diese Verhältnisse aufzuklären, hat Fischer[3]) eine grosse Anzahl von Spaltungsversuchen über eine Anzahl von Glukosidosäuren und ihre Derivate angestellt, nämlich:

Glukosidoglykolsäure
Glukosido-β-oxyisobuttersäure
Glukosidomandelsäuren
Amygdalinsäure
Cellosidoglykolsäure
Glukosidosyringasäure und.
Glukosidogallussäure.

Die Ergebnisse, über welche an anderen Stellen dieses Buches (siehe auch Tl. I, S. 246) berichtet ist, sind für die Beurteilung der Konstitutions- und Konfigurationseinflüsse auf Enzymreaktionen von grösstem Interesse. Weitere Einsichten in diese Verhältnisse würde man vielleicht durch die Bestimmung der Spaltungsgeschwindigkeit der verschiedenen Substrate gewinnen.

Es ist kein Anlass, zu bezweifeln, dass die Phenyl-β-Glukosidase diejenige Komponente des Emulsins ausmacht, welche auch die Glukosidosäuren spaltet.

N-haltige Glukoside.

Indikan und Isatan.

Unter den natürlichen N-haltigen Glukosiden ragt Indikan wegen seiner Beziehung zum Indigo hervor.

Dass Indigofera tinctoria ein Enzym enthält, welches zur Bildung von Indigo aus Indikan befähigt ist, hat v. Lookeren-Campagne[4]) zuerst erkannt. Eine Glukosidase als wirksames Agens neben einer Oxydase wurde in den Blättern von Isatis alpina von Bréaudat[5]) vermutet. Die Reaktion des

[1]) E. Fischer und Helferich, Lieb. Ann. 383, 68; 1911.
[2]) Methyl-epi-Glukosamin wird von Emulsin nicht gespalten. (Fischer, Bergmann, Schotte, Chem. Ber. 53, 509; 1920.)
[3]) E. Fischer, H. 107, 176; 1919.
[4]) v. Lookeren-Campagne, Landw. Versuchsst. 43, 401; 1894.
[5]) Bréaudat, C. r. 127, 769; 1898.

hydrolysierenden Enzyms besteht nach diesem Forscher in der Bildung von Glukose und Indigweiss, welch letzteres durch Oxydation in Indigo übergeht.

Beijerinck[1]), Hazewinkel[2]), ter Meulen[3]) und Bergtheil[4]) haben dieses Enzym näher untersucht. Auch Gaunt, Thomas und Bloxam[5]) haben ein Enzympräparat (durch Fällen mit Alkohol) dargestellt, welches aus Indikan Indoxyl abspaltet. Ein besonderes Enzym, welches nur Isatan, nicht Indikan angreift, ist nach Beijerinck in Isatis tinctoria enthalten.

Dass Indikan tatsächlich enzymatisch hydrolysiert werden kann, ist nicht zu bezweifeln. In welcher Beziehung aber die beschriebenen Enzyme zu den übrigen Glukosidasen stehen, lässt sich gegenwärtig noch nicht angeben. Isatis tinctoria und Rubia tinctoria enthalten wenig Prunasin (S. 241).

Die Indigo abspaltenden Enzyme sollen am besten in saurer Lösung wirken.

Bankankosin
aus dem Samen einer Strychnos-Art.

Dieses Glukosid ist besonders von Bourquelot und Hérissey 1908 eingehend studiert worden (C. r. 147). Es wird durch Emulsin nach folgender Gleichung zerlegt:

$$C_{16}H_{23}O_8N + H_2O = C_{10}H_{13}O_3N + C_6H_{12}O_6.$$

Puringlukoside.

Bekanntlich ist es Levene gelungen, eine Reihe von Ribosiden und neuerdings auch ein Puringlukosid aus Nukleinsäuren darzustellen[6]). Er bezeichnet diese Stoffe als Nukleoside. Dies hat E. Fischer zur synthetischen Bereitung solcher Glukoside veranlasst. Er hat mit Helferich[7]) zunächst ein Theophyllinglukosid und ein Theobrominglukosid dargestellt. Helferich[8]) hat diese Arbeiten mit der Synthese von Purin-arabinosiden und Galaktosiden fortgesetzt. Theophyllinglukosid hat Fischer durch Emulsin nicht spalten können (auch nicht durch Hefe).

Die Puringlukoside und Purinpentoside dürften in erster Linie durch tierische Enzyme angegriffen werden. Im Zusammenhang mit den Enzymen der Nukleinsäuren werden wir hierauf zurückkommen.

[1]) Beijerinck, Akad. v. Wet. Amsterdam, 1900, 572.
[2]) Hazewinkel, Akad. v. Wet. Amsterdam, 1900, 590.
[3]) ter Meulen, Rec trav. chim. Pays Bas 24, 444; 1905.
[4]) Bergtheil, Jl Chem. Soc. 85, 870; 1904.
[5]) Gaunt, Thomas und Bloxam, Jl Soc. Chem. Ind. 26, 1174; 1907.
[6]) Levene, Jl Biol. Chem. 12, 378; 1912.
[7]) E. Fischer und Helferich, Chem. Ber. 47, 210; 1914.
[8]) B. Helferich und M. v. Kühlewein, Chem. Ber. 53, 17; 1920.

7. Kapitel.

Oxynitril-β-Glukosidasen.

Wir behandeln in diesem Abschnitt diejenige Enzymgruppe, deren Substrat ein Molekül an die HO-Gruppe eines Oxynitrils — und zwar eines aromatischen oder eines aliphatischen — gebunden enthält. Die typischen Enzyme der Substrate Prunasin und Linamarin,

$$\begin{array}{c} H \\ \cdot \\ C_6H_5 \cdot C \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5 \\ \cdot \\ CN \end{array} \qquad\qquad \begin{array}{c} CH_3 \\ \cdot \\ CH_3 \cdot C \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5 \\ \cdot \\ CN \end{array}$$

Prunasin **Linamarin**

gehören zur Hauptgruppe der β-Glukosidasen. Diese Oxynitrilglukosidasen werden aber hier zu einer eigenen Untergruppe zusammengefasst, weil die Besonderheit der Bindung an eine Gruppe $\begin{array}{c} R_2 \cdot C \cdot O \\ \cdot \\ CN \end{array}$ — es wahrscheinlich macht und weil mehrere Tatsachen darauf hindeuten, dass hier eine Enzymgruppe vorliegt, welche mit den β-Glukosidasen vom Salikase-Typus nicht identisch ist.

A. Aromatische Oxynitril-β-Glukosidasen (Prunasen).

Substrate: Das typische Substrat ist das Glukosid Prunasin = d-Mandelsäurenitrilglukosid (E. Fischer)[1]), welches aus Amygdalin durch Abspaltung eines Moleküls Glukose mittels des Enzyms Amygdalase (vgl. S. 161) nach der Formel entsteht:

$$\begin{array}{l} C_6H_5 \cdot CH \cdot O \cdot C_6H_{10}O_4 \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5 \longrightarrow C_6H_5 \cdot CH \cdot O \cdot C_6H_{11}O_5 + \alpha\text{-Glukose.} \\ \qquad \cdot \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad \cdot \\ \quad CN \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad CN \end{array}$$

Ausserdem leiten sich vom Mandelsäurenitril (Benzoxynitril) noch zwei Mono-Glukoside ab, nämlich das Prulaurasin und das Sambunigrin. Prulaurasin ist die razemische Mischung von d- und l-Mandelnitril-Glukosid und entsteht sowohl aus Prunasin als aus Sambunigrin[2]) durch Razemisierung

[1]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1509; 1895.

[2]) Bourquelot und Hérissey, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 5 1907. — Arch. d. Pharm. 245, 463 u. 474; 1907.

mit verdünntem Alkali. Hérissey[1]) hat das Prulaurasin durch Einwirkung von Hefenextrakt (Amygdalase) auf Iso-Amygdalin erhalten. Die durch Caldwell und Courtauld sowie Bourquelot und Hérissey aufgeklärten Beziehungen der 3 Glukoside lassen sich schematisch folgendermassen darstellen:

Razem. ↓	Amygdalin	—Amygdalase→	Prunasin	(d-Mandelnitril-β-Gluk.)	↓ Razem.
durch	(dl) Isoamygdalin	——→	Prulaurasin	(dl-Mandelnitril-β-Gluk.)	durch
Alkali ↑	Unbekannt	——→	Sambunigrin	(l-Mandelnitril-β-Gluk.)	↑ Alkali od. Baryt[2])

Es folgen einige Daten über Vorkommen, Schmelzpunkt und Drehung der 3 Stoffe:

Glukosid	Vorkommen	Schmelzpunkt	Drehung
Prunasin	Cerasus Padus (junge Zweige)[3])	147°—149°	— 26,85°
	Prunus serotina (Rinde)[4])		
Prulaurasin	Prunus laurocerasus (Blätter)[3]) u.	120°—122°	— 52,6°
(od. Laurocerasin)	Cotoneaster microphylla (Zweige)[5])		
Sambunigrin	Sambucus nigra[6])		
	Ribes rubrum[7])	151°—152°	— 76,3°

Es sei hier noch besonders betont, dass nach der gegenwärtigen Nomenklatur d-Mandelnitril in l-Mandelsäure verseift wird.

Über die Spaltung des Amygdalins siehe S. 242.

Ein Derivat der Prunasins ist das Dhurin aus Sorghum vulgare, welches nach Dunstan und Henry[8]) bei der Spaltung HCN und p-Oxybenzaldehyd liefert.

Über Spaltung anderer Oxynitrilglukoside, besonders von Vicianin siehe S. 251 u. 252.

Vorkommen: Im Verdauungsapparat von Kaninchen und Hunden haben Moriggia und Ossi Amygdalinspaltung in Blausäure und Benzaldehyd beobachtet. Fischer und Niebel fanden bei Wiederkäuern (Rind, Schaf) keine Spaltung, dagegen starke Hydrolyse bei Pferd und Kaninchen. Über die Verbreitung eines Prunasinspaltenden Enzyms in höheren Pflanzen liegen ausgedehnte Versuche von H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton[9]) vor. In der folgenden Tabelle sind die für die Prunasin-Spaltung gewonnenen Zahlen mit denen zusammengestellt, welche für die Spaltung des Linamarins, Amygdalins und Salicins gefunden wurden.

[1]) Hérissey, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 26, 198; 1907.
[2]) Caldwell und Courtauld, Jl Chem. Soc. 91, 671; 1907.
[3]) Hérissey, Jl de Chem. et de Pharm. 26, 194; 1907. — Arch. d. Pharm. 245, 641; 1907.
[4]) Power und Moore, Jl Chem. Soc. 95, 243; 1909.
[5]) Hérissey, Jl de Chim. et de Pharm. (6) 24, 537; 1906. — Soc. Biol. 61, 399; 1906.
[6]) Bourquelot und Danjou, Arch. d. Pharm. 245, 200; 1907.
[7]) Guignard, C. r. 141, 448; 1905.
[8]) Dunstan und Henry, Proc. Roy. Soc. B. 70, 153; 1902. — Siehe auch Schröder und Dammann, Chem. Ztg. 35, 1436; 1911. Brünnich, Jl Chem. Soc. 83, 788; 1903.
[9]) H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 85, 363; 1912.

Pflanze	HCN aus			Glukose
	Linamarin	Amygdalin	Prunasin	Salicin
Prunus laurocerasus (Okt. 1910)	1,0	1,2	61,5	39,1
„ „ (Nov. 1910)	1,2	1,5	40,7	21,0
„ „ Samen	—	84,4	89,2	—
„ „ Samen-Hülse	—	1,5	9,7	—
„ amygdalus (dulcis)	2,2	1,7	13,7	—
„ „ (nana)	1,2	1,5	17,1	6,6
* „ „ (amara)	—	—	10,5	3,6
Laurus lusitanica	0,7	3,1	45.7	47,2
„ „ Samen	—	86,5	91,7	—
„ „ Samen-Hülse	—	10,7	19,5	—
Aucuba japonica	0,5	2,5	79,5	67,6
„ „ Samen	—	3,0	76,0	56,7
„ longifolium	0,5	3,2	76,5	48,7
Garrya elliptica	0,5	1,2	32,7	29,8
„ thuretii	0,7	0,7	13,2	—
Laurustinus	0,5	0,5	1,2	—
Skimmia japonica, Samen	—	—	2,2	—
*Salix rubra (1910)	0,7	3,8	16,5	27,3
„ „ (1911)	—	—	—	45,7
Epilobium angustifolium (1910)	1,5	2,3	16,5	9,6
„ „ (1910)	0,7	0,7	4,1	4,8
Epilobium angustifolium				
*Schweiz, Saas Tal (1910)	—	—	5,7	29,1
Aryshire (1911)	—	—	—	4,5
Norwegen { Myrdal (1911)	—	—	—	34,7
Norwegen { Voss-Bergen (1911)	—	—	—	14,5
Norwegen { Fjaerland (1911)	—	—	—	17,1
Epilobium hirsutum (Thames) (1911)	—	—	—	3,2
Gaultheria shallon	0,5	0,7	1,6	0,7
„ procumbens	—	—	26,0	10,0
„ „ Samen	—	—	27,5	7,0
Arbutus unedo	0,5	0,7	4,2	1,8
Calluna vulgaris	—	—	3,0	—
*Arctostaphylos uva-ursi	—	—	1,0	6,0
*Vaccinium Myrtillus	—	—	29,0	1,0
„ uliginosum	—	—	—	—
*Castanea sativa, Frühjahr 1910	1,5	6,2	65,5	55,8
„ „ Herbst 1911	—	—	—	—
Vicia sativa	1,2	1,6	11,5	—
„ cracca	8,0	7,8	24,7	15,8
„ sepium	3,2	4,5	36,9	31,8
„ sylvatica	1,8	2,5	11,1	—
„ villosa	2,5	2,5	10,0	—
Lathyrus pratensis	2,0	1,5	5,6	—
„ aphaca	1,2	0,7	2,3	—
Ononis arvensis	—	—	28,0	—
Medicago sativa	6,7	3,2	14,5	—
Onobrychis sativa	2,5	2,0	7,5	—
Trifolium pratense	2,5	2,5	8,2	-

*) Diese Blätter wurden vor dem Trocknen vollkommen gewaschen.

Pflanze	HCN aus			Glukose
	Linamarin	Amygdalin	Prunasin	Salicin
Galega officinalis	—	—	3,0	—
Lythrum salicaria	—	—	15,7	—
Spiræa ulmaria	—	—	4,0	—
Lotus corniculatus	64,5	2,7	32,0	27,8
„ uliginosus (major)	1,8	1,5	2,0	—
„ jacobæus	86,0	—	—	—
Aquilegia vulgaris	1,5	—	—	—
Thalictrum aquilegifolium	0,7	—	—	—
Asperula odorata	—	—	4,2	—
Galium verum	—	—	8,6	3,2
Isatis tinctoria	—	—	2,7	—
Rubia tinctoria	—	—	1,7	—

Die Zahlen sind in der Weise gewonnen, dass 1 g getrocknetes und gemahlenes Pulver der betreffenden Blätter zu 100 ccm 0,2 normaler Lösungen der betreffenden Glukoside gegeben wurden. Nach 24-stündiger Reaktion bei 37° wurde die prozentische Spaltung festgestellt, und zwar wurde bei den 3 ersten Glukosiden die Blausäure bestimmt, beim Salicin die Glukose.

Inwieweit diese Zahlen einer Korrektion bedürfen wegen der Abweichungen der Reaktionslösungen von der optimalen Azidität lässt sich natürlich schwer beurteilen.

Malzextrakt spaltet nach Marc van Laer[1]) Amygdalin, nicht Salicin (225).

Aziditätsbedingungen: Willstätter und Csányi (l. c.) teilen mit, dass das Aziditätsoptimum der Prunase-Wirkung bei etwa pH = 4,4 liegt und somit einen etwas anderen Wert hat, als das mit Amygdalin als Substrat gefundene (rund pH = 6). Wie aus der Fig. 34 ersichtlich ist, macht dieser Aziditätsunterschied bei der Amygdalinspaltung etwa 100 % aus. Sowohl Oberhefe [Henry und Auld[2])] als Unterhefe [Neuberg[3])] können vollständige Amygdalinspaltung bewirken.

Willstätter und Csányi verdankt man auch die folgenden Zahlenangaben über die Wirksamkeit von Mandeln und Emulsinpräparaten gegenüber verschiedenen Substraten.

Verschiedene Mandeln.

Zeitwert für Spaltung von	Bittere Mandeln		Süsse Mandeln	Aprikosenkerne
	Ältere Probe (5 Monate)	Frische Probe		
Prunasin	—	—	—	770
Amygdalin	528	500	1 240	1200, 1250
β-Methylglukosid	345 000	339 000	332 000	—
Laktose	—	860 000	—	442 000
Raffinose	645 000	610 000	423 000	308 000

[1]) Marc van Laer, Soc. Biol. 84, 471; 1921. (Vermutlich Amygdalasewirkung.) — Siehe auch Maestrini, A. R. acad. Lincei 29, 164; 1920.

[2]) Henry und Auld, Proc. Roy. Soc. B. 76, 568; 1905.

[3]) Neuberg und Färber, Bioch. Zs 78, 264; 1917.

Zeitwert für Spaltung von	Präparat 1 Zeitwert für Amygdalin frisch 10; 6 Mon. alt	Präparat 2 Zeitwert für Amygdalin frisch 18; 5 Mon. alt	Präparat 3 Zeitwert für Amygdalin frisch 41; 7 Mon. alt	Handelspräparat
Prunasin	11	39	56	130
Amygdalin	18	54	93	140
β-Methylglukosid	12 200	10 800	22 600	90 000
Laktose	26 400	75 000	111 050	486 000
Raffinose	140 000	—	142 000	170 000

Wählt man die Prunasinspaltung als Einheit, so berechnen sich aus letzterer Tabelle folgende (abgerundete) relative Zahlen.

Relativer Zeitwert für Spaltung von	Präparat 1	Präparat 2	Präparat 3	Handelspräparat
Prunasin	1	1	1	1
Amygdalin	1,6	1,4	1,65	1,08
β-Methylglukosid	1 110	277	4 000	7 000
Laktose	2 400	1 924	20 000	37 000
Raffinose	12 730	—	25 000	13 100

B. Amygdalin-Spaltung.

Substrat: Das für die Untersuchung des Emulsins am häufigsten benutzte Glukosid, das Amygdalin, ist bereits in der Einleitung zu diesem Kapitel (S. 239) sowie bei der Besprechung der Amygdalase erwähnt worden; auf S. 161 findet man seine Konstitutionsformel nach Auld angegeben.

Amygdalin kristallisiert aus Wasser mit 3 Mol. H_2O. Die Kristalle geben über Schwefelsäure 1 Mol. H_2O ab, werden bei 110°—120° wasserfrei und schmelzten dann bei 205°; die erstarrte Masse schmilzt bei 125°—130°. $[\alpha]_D = -41{,}6^0$ (Auld). Löslich in 12 Teilen Wasser, ziemlich löslich in Alkohol, unlöslich in Äther.

Die Hydrolyse des Amygdalins durch Säuren ist von Caldwell und Courtauld[1]) Walker[2]) und V. K. Krieble[3]) untersucht worden. Konz. HCl hydrolysiert zunächst die CN-Gruppe unter Bildung von Amygdalinsäure, dann entsteht l-Mandelsäureglukosid[2]); durch verdünnte Salzsäure entsteht Mandelsäurenitrilglukosid[1]). Durch Säuren wird nämlich die Bindung zwischen den beiden Glukoseresten relativ leicht hydrolysiert. Die Spaltung des Benzoxynitrils soll durch 1 n H_2SO_4 weniger beschleunigt werden als durch HCl in entsprechender Konzentration[3]). (? Vgl. hierzu die Untersuchung von Nordefeldt, Biochem. Zs. 131, 390; 1922.)

[1]) Caldwell und Courtauld, Jl Chem. Soc. 91, 666; 1907.
[2]) J. Wallace Walker, Jl Chem. Soc. 83, 472; 1903.
[3]) J. Wallace Walker und Vernon K. Krieble, Jl Chem. Soc. 95, 1369; 1909.

Nach Emmerling[1]) soll es gelingen, das natürliche Amygdalin vermittels Hefenextrakt aus Mandelsäurenitrilglukosid und Glukose zu synthetisieren.

Da, wie schon S. 163 erwähnt, an der Spaltung des Amygdalins mehrere Enzyme beteiligt sein müssen, so ist der Verlauf der Gesamtreaktion

Amygdalin ⟶ Benzaldehyd + Blausäure + 2 Mol. Glukose

kein einfacher und die Beurteilung der Geschwindigkeit an der Bildung einer einzigen Komponente ist nicht eindeutig. Von einem spezifischen Enzym der Amygdalinspaltung kann also nicht gesprochen werden.

Bezüglich des Vorkommens der beteiligten Enzyme muss auf das S. 211 Gesagte verwiesen werden. Wird Amygdalin als Substrat verwendet, so muss jedenfalls immer ausdrücklich erwähnt werden, welche Reaktion studiert, bzw. welches Spaltprodukt bestimmt wurde.

Aziditätsbedingungen: Die Abspaltung von Glukose aus Amygdalin ist hinsichtlich des Aziditätsoptimums von Willstätter und Csányi neuerdings genau untersucht worden.

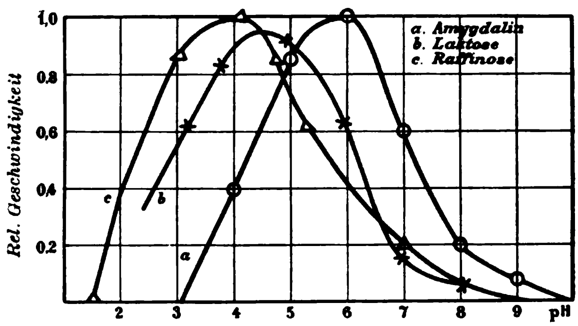


Fig. 34.

Die Abhängigkeit dieser Amygdalinspaltung von pH in der Nähe des Optimums ermittelten Willstätter und Csányi mit 1 mg Emulsin vom Zeitwert 31 bei 1-stündiger Einwirkung auf 0,1 g Amygdalin.

Puffer	pH	% Spaltung in 60 Minuten
5 Na Ac + 4 Essigsäure	5,0	62,3
0,4 sek. + 9,6 prim. Phosphat	5,5	63,1
1,2 „ + 8,8 „ „	6,0	72,5
2,0 „ + 8,0 „ „	6,25	66,25
3,0 „ + 7,0 „ „	6,5	65,0

Fig. 34 enthält ihre für verschiedene Substrate erhaltenen Resultate. Aus Kurve a geht hervor, dass das Optimum für Amygdalin bei pH = 6 liegt. Diese Zahl ist nicht sehr verschieden von der früher von Vulquin[2]) (ebenfalls mit der Sörensenschen Methodik) gewonnenen, pH = 5,5 — 5,7.

[1]) Emmerling, Chem. Ber. 34, 3810; 1901.
[2]) Vulquin, Soc. Biol. 70, 270 u. 763; 1911.

Auld fand Neutralität (pH = 7) am günstigsten: Die frühere Angabe von Bertrand und Compton[1]), das Optimum der Amygdalinspaltung trete bei schwacher Alkalinität ein, wurde von diesen Autoren später dahin ergänzt, dass beim Altern des Emulsins das Optimum zur sauren Seite übergeht[2]); dieses Ergebnis versuchen Willstätter und Csányi (l. c. S. 180) darauf zurückzuführen, dass in Bertrands Emulsin mit zunehmendem Alter vorwiegend die Amygdalase zerstört worden ist.

Neutralsalzwirkung. Kleinere Mengen Neutralsalz scheinen keinen nennenswerten Einfluss zu besitzen. Willstätter hat mit Phosphat- und Acetatpuffern gleicher Azidität übereinstimmende Wirkung gefunden.

Kinetik. Die ersten kinetischen Versuche über Amygdalinspaltung verdankt man Tammann[3]).

Amygdalinmenge	2,555	5,11	10,22
t Min. = 14	0,61	0,61	0,50
19	0,77	0,85	0,73
23	0,79	0,98	0,86

Auld[4]) hat bei seinen ausgedehnten Studien über Amygdalinspaltung die Reaktion zunächst in der Weise verfolgt, dass er die freigewordene Cyanwasserstoffsäure jodometrisch bestimmte. Im 2. Teil seiner Arbeit (S. 1279) hat er besprochen, unter welchen Umständen die Bildung von freier Blausäure und von freier Glukose parallel verlaufen müssen.

„Falls Mandelnitrilglukosid als Zwischenprodukt der Reaktion gebildet und langsamer hydrolysiert wird als Amygdalin (was der Fall zu sein scheint), dann sollen Bestimmungen der freien Blausäure und des gebildeten Benzaldehyd relativ niedrigere Spaltungszahlen ergeben als die Bestimmungen der Glukose."

„Sollte ferner das Emulsin, nachdem es sich an das β-Glukosid angelagert hat, was es offenbar als β-Enzym tun muss, die intermediäre Bildung eines $\alpha\beta$-Disaccharides veranlassen, so müssten die aus den Glukosebestimmungen gewonnenen Werte unter diejenigen fallen, welche sich aus der Messung von Blausäure und Benzaldehyd herleiten; nur im Fall, dass das Enzym die Biose-Bindung und die Cyanhydrinbindung gleichzeitig aufhebt, werden Blausäure, Benzaldehyd und Glukose stets in solchen Mengen gebildet werden, welche der Gesamtformel der Amygdalinspaltung entsprechen."

Auld gibt an, dass durch die untersuchten Emulsine das Disaccharid (die Amygdalase) nicht als Zwischenprodukt gebildet wird, und dass also durch Bestimmung von HCN und Benzaldehyd immer niedrigere Spaltungswerte erhalten werden als durch Bestimmung der Glukose. Er gibt folgende Tabelle:

[1]) Bertrand und Compton, C. r. 153, 360; 1911.
[2]) Bertrand und Compton, Bull. Soc. Chim. France (4) 29, 229; 1921.
[3]) Tammann, Zs f. physik. Chem. 3, 33; 1889 u. 18. — H. 16, 271; 1892.
[4]) Auld, H. Chem. Soc. 93, 1251; 1908.

Stunden	Angewandt g		Entstanden mg		% Spaltungsgrad berechnet aus		
	Amygdalin	Emulsin	HCN	Cu_2O kor.	HCN	Glukose[1])	Benzaldehyd[1])
0,5	0,4	0,03	5,56	609	23,5	27,8	—
1,0	0,4	0,03	10,00	1052,0	42,5	48,0	—
1,25	0,4	0,03	11,87	1280,0	50,2	58,4	49,9
2,25	0,4	0,03	17,72	1861,0	75,0	85,1	75,8
16,0	1,2	0,10	65,01	—	91,7	—	91,0
20,0	1,5	0,20	76,65	2080,0	93,4	94,9	94,0
4,0	0,3	0,06	14,30	1990,0	87,0	90,8	—
1,75	0,3	0.06	13,30	1930,0	81,5	88,1	—
0,25	0,3	0,04	4,69	—	28,4	—	28,6
24,0	1,5	0,30	79,69	2135,8	97,0	97,5	96,5

Auld zieht aus seinen Resultaten den Schluss, dass die Reaktion in zwei Stufen verläuft und dass die Biosebindung im Amygdalin gegen Emulsin weniger resistent ist als die Bindung des Benzaldehydcyanhydrins.

Da es nunmehr kaum zweifelhaft ist, dass 3 Komponenten des Emulsins an der Amygdalinspaltung beteiligt sind, so muss die relative Menge der gebildeten Glukose und der Blausäure je nach der Zusammensetzung des Enzympräparates wechseln.

Was den zeitlichen Verlauf der Blausäureabspaltung betrifft, so kann folgende Tabelle Aulds (S. 1269) als Beispiel dienen:

300 ccm 2%ige Amygdalinlösung + 15 ccm 2%ige Emulsinlösung

Minuten	x	$k \cdot 10^5$
10	6,1	255
80	45,2	295
100	54,9	309
150	75,3	347
1360	93,2	

Die natürlich vorkommenden Nitrile der Glukosidomandelsäure (Mandelnitrilglukosid und Sambunigrin) werden, wie bekannt, beide leicht von dem Emulsin angegriffen. Die Asymmetrie des einen Kohlenstoffatoms in dem Mandelnitrilrest ist also, wie E. Fischer (H. 107) erwähnt, für die Wirkung des Enzyms ohne Bedeutung. Bekanntlich werden aber diese beiden Nitrile leicht ineinander verwandelt, und Fischer weist auf die Möglichkeit der Bildung einer tautomeren Form

$$C_6H_{11}O_5 \cdot O \cdot C = NH$$
$$\cdot$$
$$C_6H_5$$

bei der Wirkung des Emulsins hin (Chem. Ber. 50, 1050).

„Komplizierter liegen die Verhältnisse bei der Amygdalinsäure und ihren Derivaten; denn sie leiten sich ab von einem Disaccharid, das selbst von Emulsin angegriffen und in Traubenzucker verwandelt wird. Hier hat man

[1]) Benzaldehyd bestimmt nach der Methode von Ripper, Glukose gravimetrisch.

also zu unterscheiden zwischen der Abspaltung von einem Molekül Traubenzucker aus dem Disaccharid und der Loslösung des zweiten Moleküls Traubenzucker aus der Glukosidgruppe. Infolgedessen ist zu erwarten, dass bei den Salzen der d-Amygdalinsäure höchstens die Hälfte der theoretisch möglichen Menge Traubenzucker entstehen kann, was mit den Beobachtungen übereinstimmt. Bei den Derivaten der l-Amygdalinsäure ist dagegen eine vollständige Loslösung des Zuckers unter günstigen Bedingungen zu erwarten. Leider kennt man diese l-Säure noch nicht in reinem Zustand. Aber die Beobachtungen bei dem Gemisch von d- und l-Säure machen jenen Schluss recht wahrscheinlich.

Bei Ester und Nitril ist auch für die Derivate der Mandelsäure völlige Abspaltung des Zuckers als d-Glukose kaum zu bezweifeln."

Mit „Phaseolunatase" aus Phaseolus lunatus beobachtete Auld folgenden Reaktionsverlauf:

10 ccm 1%ige Amygdalinlösung + 30 ccm 2%ige Enzymlösung. Temp. 40°.

Minuten	mg HCN gebildet	% Amygdalin gespalten
60	2,04	34,5
120	2,52	42,7
180	3,01	50,9
240	3,40	57,6

Polarimetrische Versuche über die Amygdalinspaltung von Henri und Lalou[1]) sind bereits S. 229 erwähnt.

Bezüglich der Bildung von Blausäure und Glukose kamen H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton[2]) zu ähnlichen Resultaten wie Auld. Die ersteren Forscher geben folgende Zahlen an (Versuchsbedingen nicht näher bezeichnet):

Stunden	Prozentische Spaltung, gemessen durch		
	Drehung	HCN	Glukose
1	14,6°	9,9	16,7
3	33,0	26,7	35,5
5	44,7	38,6	46,1
7	53,7	48,5	56,7
9	59,9	56,9	63,9
11	65,5	63,3	69,0
25	76,8	80,7	79,1

Die Fig. 35 macht die mittels der 3 analytischen Methoden erhaltenen Divergenzen noch anschaulicher. Die englischen Autoren haben eine Berechnung der obigen Zahlen, die sich auf eine zusammengesetzte Reaktion beziehen, nach der für monomolekulare Reaktionen geltenden Formel nicht für lohnend gehalten.

[1]) Henri und Lalou, Soc. Biol. 55, 868; 1903.

[2]) H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 80, 321; 1908.

Schliesslich sei eine Versuchsreihe von Willstätter und Csányi angeführt, welche die gebildete Glukose nach Sonntag-Bertrand bestimmten.

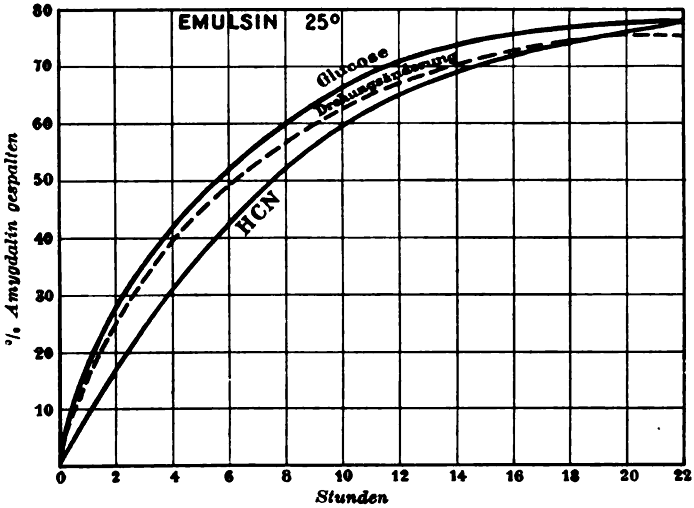


Fig. 35.

1 %ige Amygdalinlösung; 2,5 mg Emulsin; pH = 6; Temp. 30°.

Minuten	% Spaltung	$\frac{10^4}{t} \ln \frac{a}{a-x}$
12	6,68	57,5
24	10,95	48,3
40	14,50	49,2
60	22,03	41,4
90	31,84	42,5
120	39,24	41,5
180	51,75	40,4
1200	96,00	(25,7)

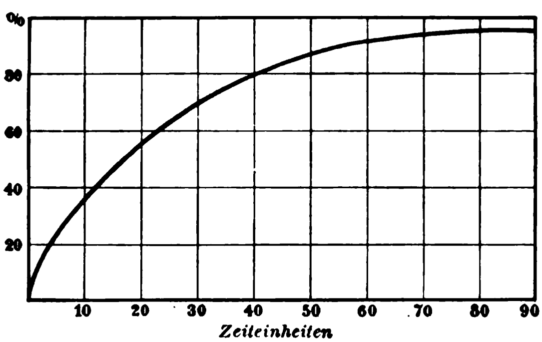


Fig. 36.

Die Figur 36 ist der gleichen Arbeit entnommen.

Einfluss der Amygdalinkonzentration. Auld verwendete zu jedem Versuch 1 ccm Emulsinlösung (2 %) in 50 ccm. Temp. 39,5°.

Minuten	Angewandt g Amygdalin	Gebildet mg HCN	Gespalten % Amygdalin
20	0,1	2,74	46,4
20	0,2	2,74	23,2
20	0,3	2,60	14,7
20	0,4	2,60	11,0
20	0,6	2 53	7,2
25	0,8	3,48	7,4
25	1,0	3,48	5,9
25	1,25	3,40	4,6
25	1,5	3,32	3,7

Bei dieser Versuchsreihe sind also die gebildeten Mengen HCN nur wenig abhängig von der anfänglichen Substratkonzentration. Dieser Befund gilt natürlich nur für gewisse Enzymkonzentrationen; er ist typisch für die Fälle, bei welchen das Substrat im Überschuss über das Enzym vorhanden ist.

Arbeitet man mit verdünnten Amygdalinlösungen, so wird die Konstante von der Konzentration des Amygdalins unabhängig, wie es die Theorie verlangt (Auld, l. c. S. 1270). Totalvolumen: 20 ccm, 3 ccm $2\,^0/_0$iger Emulsinlösung.

Minuten	Angewandt g Amygdalin	Gebildet mg HCN	Gespalten % Amygdalin	$0{,}4343\ k \cdot 10^4$ $1/t \log a/a-x$
10	0,05	1,38	0,0252	304
10	0,03	0,85	0,0155	315
10	0,02	0,53	0,0097	297

Einfluss der Enzymkonzentration. Die folgenden Zahlen von Auld (l. c. 1268) beziehen sich auf eine Versuchsreihe, bei welcher 50 ccm einer $2\,^0/_0$igen Amygdalinlösung mit einer steigenden Anzahl ccm einer $2\,^0/_0$igen Emulsinlösung gemischt wurden.

Enzymmenge	2	3	4	6	12	25	50 ccm
Nach 10 Minuten hydrolysiert in %	3,6	6,0	8,9	12,5	17,1	21,6	24,1

Willstätter und Csányi fanden:

Versuchs-Nr.	mg Emulsin	Minuten	% Spaltung
1	0,5	60	40,10
	1,0	30	40,37
2	0,5	120	62,27
	1,0	60	60,70
	5,0	12	62,27

Das Produkt Zeit × Enzymmenge zeigt also eine sehr befriedigende Konstanz.

Der Einfluss der Spaltprodukte ist von Auld recht eingehend studiert worden. Die charakteristischen Ergebnisse seien hier mitgeteilt:

20 ccm 2%ige Amygdalinlösung + 1 ccm 2%ige Emulsinlösung. Reaktionszeit 30 Minuten. Temp. 40°.

Zugesetzte Glukose		Gebild. HCN	Gesp. Amygdalin
g	mg-Mol.	mg	%
0	0	3,2	13,5
0,2	1,1	3,1	13,3
0,4	2,2	3,0	12,6
0,75	4,2	2,8	11,8
1,0	5,5	2,7	11,6

Etwas stärkere Verzögerungen wurden durch Benzaldehyd hervorgerufen.

Gesättigte Benzaldehydlösung + 20 ccm 2%ige Amygdalinlösung + 2 ccm 2%ige Emulsinlösung. Vol. 50 ccm. — Reaktionszeit 30 Min. — Temp. 40,5°.

Zugesetzt Benzaldehyd mg-Mol.	Gebild. HCN mg	Gesp. Amygdalin %
0	6,1	26,0
0,031	6,0	25,8
0,157	5,45	23,1
0,314	5,1	21,7
0,471	4,7	20,0

Schliesslich ergaben die Zusätze der gemischten Reaktionsprodukte der Grössenordnung nach dem obigen entsprechende Resultate.

Spaltungsgrenze.

Wie Tammann so hat auch Auld keine vollständigen Spaltungen in verdünnten Amygdalinlösungen erzielt. Er gibt für eine bei 40° angestellte Versuchsreihe folgende Tabelle an:

Stunden	Angewandt		Abgespalten %	
	ccm 2%ig. Emulsinlösung	ccm 2%ig. Amygdalinlösung	HCN	Benzaldehyd
20	10	75	93,4	94,0
24	15	75	97,0	96,5
16	3	15	91,7	91,0

Hemmungsstoffe. Nach Hébert[1]) sollen Zirkonium- und Thoriumsulfat schon in kleinen Konzentrationen schädigen, nicht dagegen Cer- und Lanthansulfat (Aziditätsbeeinflussung?).

[1]) Hébert, Bull. Soc. Chim. 35, 1209; 1906.

Die gebräuchlichen anästhetischen Mittel Toluol, Chloroform, Äther, auch Thymol sind ohne Wirkung. Dagegen wird Formaldehyd als Paralysator angegeben.

Zerstörung durch andere Enzyme. Eine ältere Angabe von Claude Bernard, dass Magensaft das Amygdalin-spaltende Enzym zerstört, ist wohl auf die hohe Azidität dieser Flüssigkeit zurückzuführen[1]).

Einfluss der Temperatur und der Strahlung auf die Spaltungsgeschwindigkeit.

Die folgenden Versuchszahlen sind ebenfalls der Arbeit von Auld entnommen. Ich habe die angegebenen k-Werte graphisch interpoliert und daraus die Koeffizienten A der Temperaturformel (29) I. Teil, S. 172, berechnet.

Temperatur	gef.	$k \cdot 10^4$ (interpoliert)	A (interpoliert)
15	139	—	—
20	263	245	—
25	330	350	11 900
30	478	478	10 800
35	707	625	10 400
40	807	807	10 150
45	970	1060	9 900
50	1384	1330	—
55	1015	—	—
60	914	—	—

A bei 25° etwa = 11000. Wie bei den meisten enzymatischen Reaktionen nimmt A mit steigender Temperatur ab.

Strahlung.

Einige Angaben über die Wirkung des Sonnenlichtes findet man bei Marino, (Arch. de Fisiol. 8, 40; 1910); durch ultraviolettes Licht tritt nach dem Befund non Giaja[2]) Inaktivierung ein.

Bildung und Variation der Amygdalin-spaltenden Enzyme in Pflanzen.

Hérissey teilt in seiner mehrfach erwähnten Dissertation 1899 die interessante Beobachtung mit, dass sich in Samen von Cerasus avium Emulsin zeitiger bildet als Amygdalin.

Man findet in der bereits zitierten Mitteilung von Armstrong und Eyre einige Angaben, welche den Wechsel der Aktivität und der Mengen der Enzyme mit der Jahreszeit betreffen.

Siehe ferner Guignard, Jl de Pharm. et de Chem. (5) 21, 233; 1890.

[1]) Siehe hierzu Frouin und Thomas, Soc. Biol. 60, 1039; 1906.

[2]) Giaja, Soc. Biol. 72, 2; 1912.

C. Spaltung anderer Nitril-β-Glukoside.

Spaltung des Linamarins. Ein HCN-abspaltendes Enzym wurde von Jorissen und Hairs[1]) mit Linamarin im unreifen Samen von Linum usitatissimum entdeckt. Dunstan, Henry und Auld[2]), die es in Phaseolus lunatus fanden und studierten, änderten den Namen Linase in Phaseolunatase um. Weitere Angaben über die Verbreitung und Eigenschaften des Enzyms findet man bei Auld sowie bei H. E. Armstrong und Eyre[3]) wie auch bei Armstrong und Horton (Proc. 82, 349). Siehe auch die Tab. S. 240.

Substrat. Durch die S. 238 angegebene Formel des Linamarins ist dieses Substrat bereits als ein Acetonoxynitril-Glukosid charakterisiert. Die Synthese des Linamarins ist von E. Fischer und Anger[4]) durchgeführt worden, und zwar aus Aceto-bromglukose und Oxy-isobuttersäure-äthylester; über Glukosido α-oxy-isobutyramid entstand Tetraacetyl-linamarin und daraus durch NH_3 Linamarin. Das synthetische Glukosid schmolz bei 142—143° (korr.); Dunstan und Henry hatten für das natürliche Glukosid 141° gemessen.

In 3%iger wässriger Lösung war $[\alpha]_D^{18} = -29{,}1^0$ für das synthetische Glukosid, während für das natürliche niedrigere Drehungen, 27,4° bis 27,2° (de Jong) angegeben waren.

Dieses Glukosid ist aber für die Glukosidase des Leins keineswegs spezifisch, dann auch Prunasin, Salicin und β-Metylglukosid werden von Enzympräparaten aus Linum-Arten zerlegt.

Die Annahme einer besonderen „Linase" war darin begründet, dass Amygdalin von Leinenzymen gar nicht angegriffen wird. Dies besagt aber zunächst nur, dass im Lein eine Amygdalase fehlt. Es ist dann allerdings noch zu bemerken, dass durch Leinenzym die unveränderte Amygdalose nicht abgespalten wird. Das Phaseolus-Enzym greift aber sowohl Prunasin als Linamarin an, während Prunase gegen Linamarin wirkungslos ist.

H. E. Armstrong[5]) deutet die gefundenen Tatsachen so (Proc. 85, 372), dass Linase nicht so spezifisch wirkt wie Prunase. „The smaller key can be passed into both locks, but the larger will not fit into that, to wich the smaller key properly belongs."

Ob also die Fähigkeit des Leinenzympräparates, das Substrat $(CH_3)_2 \cdot C\begin{matrix} \diagup OH \\ \diagdown CN \end{matrix}$ in Aceton und HCN zu zerlegen, auf eine „Acetcyanase" zurückzuführen ist, bleibt noch unentschieden.

---

1) Jorissen und Hairs, Bull. Acad. R. Belg. (3) 21, 529; 1891.

2) Dunstan, Henry und Auld, Proc. Roy. Soc. B. 78, 145; 1906 und 79, 315; 1907. — Siehe auch Dunstan und Henry, ebenda 72, 285; 1903.

3) H. E. Armstrong und Eyre, Proc. Roy. Soc. B. 85, 370; 1912.

4) E. Fischer und Gerda Anger, Chem. Ber. 52, 854; 1919.

5) H. E. Armstrong und Eyre, Proc. Roy. Soc. B. 85, 370; 1912.

Ähnliche Enzymkomplexe sind weiter von H. E. Armstrong[1]) in Lotus corniculatus (verschiedener Standorte) und von van Romburgh[2]) in Hevea brasiliensis und Manihot utilissima gefunden worden.

Spaltung des Vicianins. Wie G. Bertrand[3]) gefunden hat wird Vicianin, das in Vicia angustifolia und Vicia macrocarpa vorkommt, enzymatisch in Vicianose (eine Gluko-Arabinose), HCN und Benzaldehyd gespalten. (Vicianin unterscheidet sich vom Amygdalin also nur durch die zweite Zuckerkomponente.) Das Enzym Vicianinase, welches diese Fähigkeit besitzt, haben Bertrand und Rivkind in den meisten Leguminosensamen gefunden. Ob es von der Prunase verschieden ist steht noch nicht ganz fest. Siehe auch H. E. und E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 85, S. 360. In den beiden genannten Vicia-Arten wird das HCN und Phenylglykol abspaltende Enzym nicht von einem weiteren Enzym begleitet, welches die Vicianose zerlegt. Ein Enzym, welches Vicianose in Glukose und Arabinose hydrolisiert, haben Bertrand und Weissweiller[4]) in Helix Pomatia (?) gefunden. Vielleicht gehört es, wie Amygdalase, der α-Reihe an.

Anhang.

Spaltung des Glykolnitrilcellosids. Dieses Glukosid wurde von E. Fischer und Anger[5]) aus Azeto-bromcellose synthetisch erhalten und auf sein Verhalten gegen Emulsin geprüft. Mit käuflichem Emulsin wurde bei 37° in 24 Stunden 92—96% der theoretischen Menge Traubenzucker gewonnen.

Spaltung des Gynokardins. Aus diesem Glukosid, das unter anderem in den Samen von Gynocardia odorata vorkommt, lässt sich 1 Mol. Glukose, HCN und eine Verbindung gewinnen, welche vermutlich ein Trioxyaldehyd oder Keton ist[6]). Der Unterschied des in Gynacardia wirksamen Enzyms, Gynokardase, gegen Phaseolunatase dürfte gering sein.

Zur Frage, ob ein besonderes Enzym vorliegt, siehe Moore und Tutin (Trans. Chem. Soc. 97; 1910). Ein Enzym in Pangium edule beschreibt de Jong (Rec. trav. chim. Pays-Bas 30; 1911).

Spaltung des Lotusins. Dunstan und Henry[7]) haben aus Lotus arabicus das Glukosid Lotusin isoliert. Es enthält das Flavonderivat Lotoflavin (1, 3, 3′ 5′-Tetraoxyflavon) und einen Maltosecyanhydrinrest. Es soll sich vom Amygdalin dadurch unterscheiden, dass die CN-Gruppe an den Zucker gebunden ist. Wenn sich dies bestätigt, wäre das betreffende Enzym, die „Lotase", nicht hier der Prunase anzureihen, sondern den Flavonolglukosidasen (S. 234).

---

[1]) H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 84; 471; 1912.

[2]) van Romburgh, Ann. Jardin Buitenzorg 16, 1; 1899.

[3]) Bertrand, C. r. 143, 832; 1906. — Bertrand und Rivkind, C. r. 143, 970; 1906. — Bertrand und Weissweiler, C. r. 147, 252; 1908 und 150, 180; 1910.

[4]) Bertrand und Weissweiller, C. r. 151, 325; 1910.

[5]) E. Fischer und Gerda Anger, Chem. Ber. 52, 854; 1919.

[6]) Power und Lees, Proc. Chem. Soc. 21, 88; 1905. — Jl Chem. Soc. 87, 349; 1905.

[7]) Dunstan und Henry, Proc. Roy. Soc. B. 67, 224; 1901 u. 68, 374; 1901.

Zur Kenntnis der HCN-liefernden Pflanzen sei auf die eingehende Übersicht von Greshoff[1]) verwiesen.

Weitere Literatur über enzymatische Spaltung von Nitril-Glukosiden:

Heut, Arch. d. Pharm. 239, 582; 1901.

van Italie, Arch. d. Pharm. 243, 553; 1905 und 248, 251; 1910.

Bourquelot, C. r. 117, 383; 1893. — Bourquelot und Hérissey, Bull. Soc. Myc. France 10, 49; 1899 und 11, 19; 1895. — C. r. 121, 693; 1895.

Puriewitsch, Bot. Ber. 16, 368; 1898.

D. Vorgänge und Gleichgewichte im System Benzaldehyd, Cyanwasserstoffsäure, Wasser und Oxynitril.

Obwohl es sich durch die Arbeiten der letzten Jahre gezeigt hat, dass sich das Gleichgewicht

$$C_6H_5 \cdot CHO + HCN \rightleftarrows \text{rac. } C_6H_5 \cdot CH\begin{matrix} \diagup OH \\ \diagdown CN \end{matrix}$$

ohne Mitwirkung enzymatischer Katalysatoren von beiden Seiten her einstellt, ist eine eingehendere Behandlung dieser Reaktion gerechtfertigt und sogar notwendig. Denn an Vorgängen wie die Spaltung und Bildung des Benzoxynitrils ist Gelegenheit gegeben, die Wirksamkeit enzymatischer und nicht enzymatischer Katalysatoren zu vergleichen und in die Besonderheiten der ersteren einzudringen.

1. Symmetrische Reaktion und Gleichgewicht (ohne Mitwirkung von Emulsin).

Als erste Untersuchungen, welche in diesem Zusammenhang interessieren, sind diejenigen von Lapworth[2]) und Ultee[3]) zu nennen, welche unter anderem die Tatsache behandeln, dass die Synthese des Oxynitrils durch geringe Mengen von Alkali beschleunigt, durch geringe Säuremengen verzögert wird. In einer eingehenderen Arbeit fand dann Wirth[4]), dass Hydroxylionen die Geschwindigkeit, mit der das Gleichgewicht von beiden Seiten erreicht wird, vergrössern, Wasserstoffionen dagegen die beiden Reaktionen verzögern. Ferner fand er, dass die Dissoziation des Oxynitrils bei Verdünnung und bei Erwärmung zunimmt, um bei Konzentrierung und bei Abkühlung wieder zurückzugehen.

Ein wesentlicher Fortschritt ist in diesem Gebiet durch die Messungen von Nordefeldt[5]) erzielt worden, welcher die Geschwindigkeit der Bildung und der Spaltung des Oxynitrils unter dem Einfluss verschiedener Aziditäten untersuchte[6]).

[1]) Greshoff, Arch. d. Pharm. 244, 397 u. 665; 1905.

[2]) Lapworth, Jl Chem. Soc. 83, 995; 1903.

[3]) Ultee, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 28, 1 und 248; 1909.

[4]) Wirth, Arch. d. Pharm. 249, 382, 1911.

[5]) Nordefeldt, Biochem. Zs 118, 15; 1921.

[6]) Siehe bezüglich dieses Einflusses auch die Mitteilung von Krieble und Wieland (Jl Amer. Chem. Soc. 43, 164; 1921).

Es seien zunächst einige Versuche Nordefeldts als Beispiele angegeben. **Methodik:** Titration der freien HCN mit $AgNO_3$ nach Volhard.

Synthese: Reaktionsgemisch: 5 ccm = 5,141 g C_6H_5CHO + 36,71 ccm HCN-Lösung (1,32 norm.) + 0,06 ccm verdünnte Schwefelsäure.

Stunden	ccm Ag NO_3 für 2 ccm Lösung	% HCN gebunden	$k \cdot 10^3$
2,5	22,7	2,2	0,09
4,75	22,6	2,5	0,05
24	20,8	10,3	0,03
72	17,5	24,6	0,04
198	12,2	47,7	0,04
240	10,5	54,7	0,09

Mittel: $k \cdot 10^3 = 0,06$; pH = 2,9.

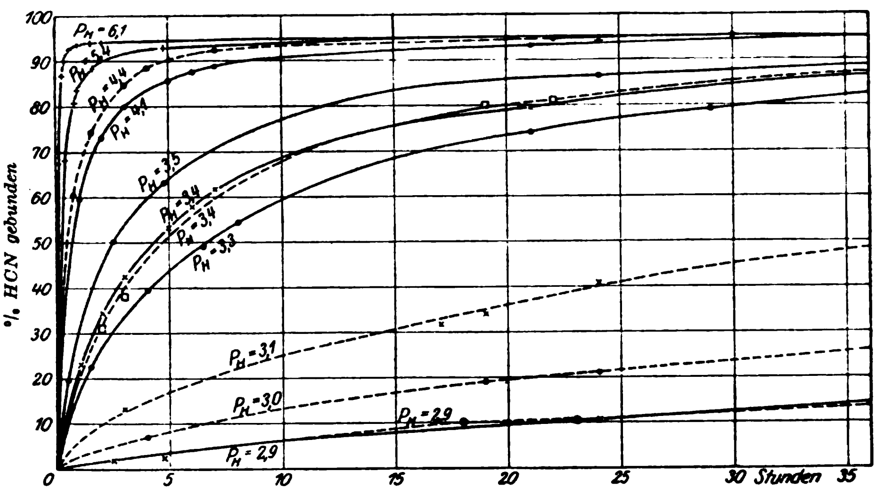


Fig. 37. Die Geschwindigkeit der Oxynitrilsynthese bei verschiedenen Aziditäten. Die Kurven der Versuche bei Gegenwart von Emulsin sind gestrichelt.

Dasselbe Gleichgewicht wurde bei der Spaltung und Bildung des Oxynitrils erhalten.

Einige Zahlen bezüglich des Zusammenhanges zwischen Azidität und Spaltungsgeschwindigkeit findet man in folgenden Tabellen. Ausgangsmaterial war ein Reaktionsgemisch mit 95,1 % gebundenem HCN; je 2 Proben von 10 ccm wurden schwach alkalisch bzw. sauer gemacht und in Alkohol zu 100 ccm gelöst.

pH = 7,5

Stunden	$AgNO_3$ ccm verbr.	HCN % geb.
0,02	1,55	87,4
6	1,55	87,4
22	1,55	87,4

pH = 2,9

Stunden	$AgNO_3$ ccm verbr.	HCN % geb.
0,02	0,5	95,1
6	0,5	95,1
22	0,5	92,7

Die der Arbeit von Nordefeldt entnommene Fig. 37 veranschaulicht, wie (bei unveränderter Temperatur und Konzentration) die Geschwindig-

keit der Synthese von der Azidität der Lösung bestimmt wird. Zwischen pH = 3 und 6 vermindert sich die Reaktionszeit von etwa zwei Monaten bis auf eine Stunde, d. h. die Geschwindigkeit wird dadurch ausserordentlich vergrössert, um bei Neutralität der Lösung unmessbar gross zu werden.

Der genannte Zusammenhang zwischen Azidität und Geschwindigkeit geht auch aus folgender Zusammenstellung hervor:

pH	2,9	3,0	3,1	3,3	3,4	3,5	4,1	4,4	5,3	6,1	8,0
$k \cdot 10^3$	0,06	0,11	0,3	1,4	2,2	3,6	12	18	50	290	2000

Mit diesen Zahlen ist die Kurve in Fig. 38 gezeichnet.

Auch bei der Spaltung des Oxynitrils findet man einen derartigen Zusammenhang zwischen Geschwindigkeit und Azidität (siehe oben).

In einer genügend sauren Lösung (pH = ca. 3) verläuft folglich sowohl die Bildung wie die Spaltung des Oxynitrils äusserst langsam. Damit werden also auch die früheren qualitativen Resultate von Ultée u. a. bestätigt, nach welchen Benzoxynitril in saurer Lösung recht beständig ist.

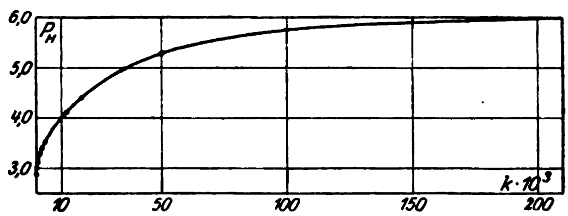


Fig. 38. Azidität und Reaktionsgeschwindigkeit bei der Oxynitrilsynthese.

Der Zusatz von Emulsin hat, wie schon Bayliss (1913) und Krieble (1915) fanden, keine Veränderungen im Gleichgewicht zur Folge. Dagegen wird von Emulsin, wie von anderen Substanzen, die pH steigern, die Geschwindigkeit der Synthese entsprechend vergrössert. In einer Mischung mit Geschwindigkeitskonstante $k \cdot 10^3 = 3{,}6$ wird z. B. durch Zusatz von 0,2 g Emulsin diese auf den Wert 18 erhöht (Nordefeldts Versuche 4 und 9). Der Grund ist, dass das Emulsinpräparat, wie andere Eiweissstoffe, die Säure (Benzoesäure) zu binden vermag, die bei der Oxydation des Aldehyds gebildet wird; diese Bildung geschieht bei reichlicher Luftzufuhr sehr schnell.

Wesentlich ist ausserdem, dass bei Gegenwart von Emulsin das Oxynitril optisch aktiv (asymmetrisch) gefunden wird.

2. Wirkungen von verschiedenen Emulsinpräparaten.

Die ersten Untersuchungen über Einwirkung des Emulsins auf die Bildung und Spaltung des Oxynitrils verdankt man Rosenthaler[1]), welcher damit zweifellos eine Reihe interessanter Probleme entrollt und im Verlauf seiner Arbeiten auch bemerkenswerte Tatsachen gefunden hat.

[1]) Rosenthaler, Biochem. Zs 14, 238; 1908. — 17, 257; 1909. — 19, 186; 1909; 26, 1 u. 7; 1909. — 28, 408; 1910. — 50, 486; 1913. — Arch. d. Pharm. 246, 365; 1908. — 248, 105 u. 534; 1910. — 249, 510; 1911. — 251, 56 u. 85; 1913.

Rosenthalers Befund (Arch. d. Pharm. 1908), dass bei Gegenwart von Mandel-Emulsin aus Benzaldehyd und HCN rechtsdrehendes d-Benzaldehydcyanhydrin (d-Benzoxynitril) entsteht ist eine nunmehr sicher gestellte Tatsache.

Feist[1]) fand linksdrehendes Benzoxynitril, wenn eine Lösung von inaktivem Oxynitril mit Emulsin behandelt und dabei ein Luftstrom durch das Gemisch geleitet wurde. Durch diese Wegführung der Spaltprodukte gelang es ihm, auch aus anderen Oxynitrilen die l-Form im Überschuss zu erhalten. Die Drehungsrichtung der durch Spaltung gewonnenen Oxynitrile war also der durch Synthese dargestellten entgegengesetzt, und mit Hilfe von Emulsin konnten jetzt beide optischen Isomeren erhalten werden. Im Gegensatz zu Rosenthaler nimmt Feist an, dass das d-Oxynitril, welches bei Amygdalinspaltung mit Emulsin gefunden wird, schon als solches im Amygdalin vorhanden ist, und bei der Spaltung frei wird.

Venth[2]), ein Schüler Rosenthalers, findet, dass die asymmetrische Oxynitrilsynthese sich bei Verwendung einer ganzen Reihe von enzymartigen Präparaten vollzieht, die aus den verschiedensten Pflanzen gewonnen werden können, wobei in der Regel d-Oxynitril erhalten wird. In einem Falle aber (mit einem Präparat aus den Blättern von Taraktogenos Blumei) erhielt er die l-Form, wodurch er die Existenz eines synthetischen l-Enzymes (l-Oxynitrilese) bestätigt findet.

Nordefeldt[3]) hat eingehend untersucht, wie sich in einer Lösung, welche Mandel-Emulsin als Katalysator enthält, die optische Drehung der Lösung mit der Zeit ändert, und wie diese zeitliche Drehungsänderung von der Temperatur und der Emulsinmenge abhängt. Die folgende Darstellung schliesst sich zum grossen Teil an die Untersuchungen Nordefeldts an.

Emulsinpräparate: Wegen der Herstellung des Roh-Emulsins sei auf das S. 212 Gesagte verwiesen. Auch für die Herstellung solcher Präparate, welche im System Benzaldehyd, Blausäure, Oxynitril wirken sollen, empfiehlt sich bei der Herstellung aus Mandeln die Extraktion in schwach alkalischer Lösung.

Rosenthaler hat seine systematischen Versuche mit einem käuflichen Präparat von Th. Schuchardt ausgeführt (vgl. Biochem. Zs 14, S. 242). Er schrieb die von ihm entdeckte asymmetrische, synthetisierende Wirkung des Emulsins einem besonderen Bestandteil desselben zu, den er

syn-Emulsin (σύν-Emulsin, σ-Emulsin) nannte.

H. E. Armstrong und Horton[4]) sprechen im gleichen Sinne von einer Benzcyanase, und nach einem Nomenklaturvorschlag des Verfassers[5]) wäre ein Enzym, dessen Wirksamkeit in der Synthese von d-Oxynitril besteht, als d-Oxynitrilese zu bezeichnen.

Nach Rosenthaler konnte das syn-Emulsin in mehr oder weniger reiner Form dadurch isoliert werden, dass eine Emulsinlösung während 1 bis 2 Wochen auf 40—45° erwärmt wurde, oder durch Behandeln von Emulsin

[1]) Feist, Arch. d. Pharm. 247, 226 und 542; 1909. — 248, 101; 1910.
[2]) Venth, Diss. Strassburg 1912.
[3]) Nordefeldt, Biochem. Zs 130; 1922.
[4]) H. E. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 82, 349; 1910.
[5]) Euler, H. 74, 13; 1911.

zuerst mit Schwefelsäure und dann mit einer der Säure äquivalenten Menge von Alkalihydroxyd, wodurch in beiden Fällen die übrigen enzymatischen Bestandteile beinahe vollständig zerstört wurden. Die enzymatische Wirkung des syn-Emulsins wurde vom Überschuss an Benzaldehyd, nicht aber von Cyanwasserstoff, geschwächt. Die Eigenschaft des syn-Emulsins, zur Bildung von optisch aktiven Oxynitrilen zu führen, zeigte sich nicht nur beim Benzaldehyd, sondern es gelang Rosenthaler, von verschiedenen Aldehyden ausgehend, eine ganze Reihe von asymmetrischen Oxynitrilen darzustellen, von welchen die meisten rechtsdrehend waren.

Als Krieble[1]) fand, dass Präparate aus Blättern von wilder Kirsche (Prunus serotina) und aus Pfirsichblättern linksdrehendes Oxynitril gaben, wurde darin eine neue Oxynitrilese, l-Oxynitrilese, angenommen.

Etwa gleichzeitig mit Krieble hat auch Rosenthaler[2]) Fälle mitgeteilt, in welchen er die Bildung von l-Oxynitril beobachtet hat.

dia-Emulsin. Zum Unterschied von syn-Emulsin wurde von Rosenthaler der enzymatische Bestandteil des Emulsins, welcher Amygdalin wie übrige β-Glukoside spaltet, dia-Emulsin (διά-Emulsin, δ-Emulsin) genannt.

Dieses Enzym soll nach Rosenthaler isoliert werden können, wenn eine Emulsinlösung mit einer gesättigten Lösung von Magnesiumsulfat oder mit Kupfersulfat gefällt wird, wobei es im Filtrat verbleibt. Er findet jedoch, dass die Methode mit Kupfersulfat bisweilen versagen kann. Durch Erwärmung während längerer Zeit auf 40—45° wurde das dia-Emulsin grösstenteils zerstört, eine Lösung von syn-Emulsin ertrug aber eine kurze Erhitzung bis 70—80°.

Weil das dia-Emulsin aus Amygdalin Benzaldehyd und Cyanwasserstoff abspaltet, sollte es auch das Zwischenprodukt Benzoxynitril zerlegen können. Die synthetisierende Wirkung des syn-Emulsins würde folglich bei Anwesenheit von dia-Emulsin mehr oder weniger geschwächt, wodurch der sehr variierende Effekt verschiedener Emulsinpräparate des Handels erklärt wäre.

Von Nordefeldts[3]) Angaben über sein Mandel-Emulsinpräparat sind zunächst diejenigen erwähnenswert, welche sich auf das Verhalten bei der Dialyse beziehen.

Die Dialysen gingen bei Anwesenheit von Toluol in einer Anzahl Kollodiumschläuchen vor, je etwa 15 ccm fassend, 3 Tage lang, mit oft wiederholtem Umtausch von Aussenflüssigkeit, deren totales Volumen 1500 ccm betrug, und die dann bei 30—35° zum Volumen 50 ccm im Vakuum eingeengt wurde.

Aschenanalyse.

PO_4	75,79 %
K_2O	14,55 „
CaO	7,45 „
MgO	1,48 „
SiO_2	0,32 „

[1]) Krieble, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 1643; 1913.
[2]) Rosenthaler, Arch. d. Pharm. 251, 85; 1913.
[3]) Nordefeldt, Biochem. Zs 131, 390; 1922.

Dialyse I. Emulsinlösung 300 ccm.

Nichtdialysierte Lösung	Dialysierte Lösung (Innenflüssigkeit)	Aussenflüssigkeit
pH = 6,08 Trockensubstanz = 12,1 mg/ccm	pH = 6,04 Trockensubstanz = 9,2 mg/ccm	pH = 5,73 Trockensubstanz = 14,3 mg/ccm = 2,4 mg/ccm von der ursprünglichen Lösung. Davon Kohlehydrate (als Glukose berechnet) 3,0 mg/ccm = 21 % der Trockensubstanz
Asche = 0,84 mg/ccm = 6,94 % der Trockensubstanz	Asche nicht nachweisbar	Asche = 4,5 mg/ccm = 35 % der Trockensubstanz
Dialyse II.		
pH = 6,39 Trockensubstanz = 12,2 mg/ccm	pH = 5,88 Trockensubstanz = 9,7 mg/ccm	pH = 5,88 Trockensubstanz = 5,7 mg/ccm. Davon Kohlehydrate (als Glukose berechnet) 1,3 mg/ccm = 23 % der Trockensubstanz
Asche = 0,9 mg/ccm = 7,37 % der Trockensubstanz	Asche nicht nachweisbar	Asche = 1,9 mg/ccm = 33 % der Trockensubstanz

Die Aussenflüssigkeit enthielt nach der Dialyse, ausser einer geringen Menge stickstoffhaltiger Stoffe (die beim Erhitzen der Lösung koagulierten), lösliche Kohlehydrate, die nach Hydrolyse mit verdünnter Schwefelsäure und Bestimmung nach Bertrands Methode, als Glukose berechnet, bzw. 21 % und 23 % von dem Trockengewicht der Substanz ausmachten. Ausserdem enthielt die Aussenflüssigkeit anorganische Stoffe (hauptsächlich Kalium- und Kalziumphosphat) bis zu einem Gehalt von bzw. 35 % und 33,3 %.

Diese nach der Dialyse entfernte Aussenflüssigkeit zeigte an sich keine merkbare optisch-aktivierende Wirkung bei der Oxynitrilsynthese und enthielt also keine nachweisbare Menge des betreffenden Katalysators.

Die dialysierte Emulsinlösung, die Innenflüssigkeit, zeigte auch nur geringe oder keine katalytische Wirkung. Wenn aber die beiden Flüssigkeiten gemischt wurden, zum gleichen Volumen wie vor der Dialyse, wurde wieder deutliche optische Aktivität erhalten, obgleich nicht eine so starke wie mit der ursprünglichen undialysierten Lösung.

Indessen tritt bei Verwendung nur dialysierter Lösung eine neue Erscheinung auf. Im Gegensatz zu einer gewöhnlichen Emulsinlösung, aus welcher bei Vermischung mit dem Substrat sofort reichlich Protein ausfällt, ergibt eine dialysierte Lösung keine Fällung, wenn sie dem Substrat zugesetzt wird, sondern höchstens eine starke Opaleszenz. Diese verschwindet aber nicht und kann auch nicht durch Filtrierpapier entfernt werden, weshalb die Polarisierung in einem längeren Rohr dann unmöglich und auch in $^1/_2$ dm-Rohr so erschwert ist, dass zuverlässige Resultate nicht haben gewonnen werden können, obgleich es den Eindruck gemacht hat, dass optische Aktivität dabei nicht entstanden ist.

Falls aber eine solche dialysierte Emulsinlösung wieder mit Aussenflüssigkeit versetzt wird, erhält man mit dem Substrat wieder die Proteinfällung und deutliche optische Aktivität wird ausgebildet; auch die auf 80° erhitzte Aussenflüssigkeit und selbst die Asche genügt zu dieser Reaktivierung; ausser Phosphat zeigen auch $MgSO_4$ und andere Salze mehrwertiger Ionen diesen Effekt.

3. Kinetik der enzymatischen Oxynitrilbildung.

Zunächst zeigte sich, dass die optische Aktivität mit der Zeit abnimmt, während die totale Menge des Oxynitrils konstant bleibt.

Versuch: 0,1 g Emulsin + 10 ccm Wasser + 9 ccm HCN (1,1 N) + 1,05 g C_6H_5CHO. Methode I. Titriertes Volumen 5 ccm. $AgNO_3$ 0,05 N.

a) Temperatur 17°.

Stunden	Drehung in Graden	HCN % geb.	k · 10³ berechnet
1	0,98	51,2	4,2
3	1,35	65,4	
70	1,00	70,1	

b) Temperatur 36°.

Stunden	Drehung in Graden	HCN	k · 10³
1/4	1,05		7,1
1/2	1,17	64,3	
1	1,13	68,3	
1 1/2	1,05	69,3	
6 1/2	0,80	69,5	

„Die Bildungsgeschwindigkeit sowohl asymmetrischen wie totalen Oxynitrils steigt also mit der Temperatur. Ehe die totale Synthese ihr Maximum noch erreicht hat, fängt indessen die Asymmetrie an abzunehmen, und dies geschieht schneller bei höherer Temperatur, wodurch sich erklärt, dass dieselbe dann nicht so starke Entwicklung erreicht. Dies deutet darauf hin, dass ein die Asymmetrie aufhebender Faktor in die Reaktion eingreift, und der Einfluss dieses Faktors scheint mit steigender Temperatur zuzunehmen."

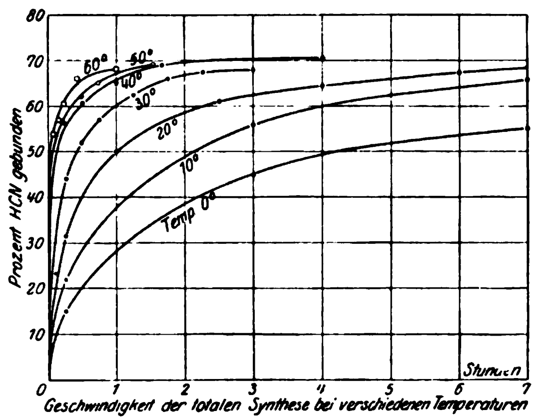


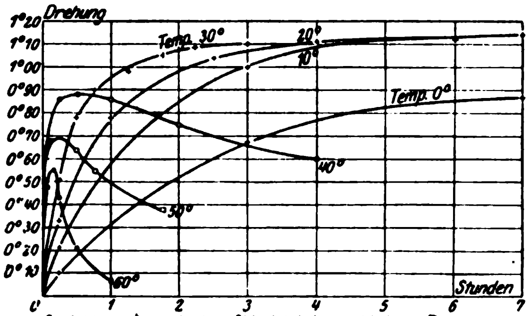
Fig. 39.

Den Verlauf der totalen Synthese bei verschiedenen Temperaturen ersieht man aus der Fig. 39. Man sieht, wie die Geschwindigkeit der totalen Synthese steigt. Von der Temperatur unabhängig steigt in allen Fällen die Menge des totalen Oxynitrils zu ungefähr ein und demselben Endwert, und dieser erleidet dann mit der Zeit keine Veränderung.

Innerhalb jedes einzelnen Versuches sinken die Werte der Reaktionskonstanten k ziemlich schnell mit der Zeit, was sich daraus erklärt, dass das zurückbleibende Benzaldehyd von der Luft oxydiert wird und dadurch die Azidität der Lösung immer mehr steigert, wodurch die Synthese langsamer geht.

Die optische Aktivität dagegen bildet sich bei niedriger Temperatur zwar langsamer aus, wie das totale Oxynitril, und bei höherer Temperatur schneller, aber das erreichte Maximum bleibt nicht konstant,

sondern beginnt, wie schon Rosenthaler[1]) gefunden hat, asymptotisch gegen Null zu sinken. Mit steigender Temperatur wird dieses Maximum immer niedriger und seine Abnahme immer schneller, wie die Fig. 40 zeigt.



Ausbildung der optischen Aktivität bei verschiedenen Temperaturen

Fig. 40.

„Augenscheinlich steigt die Stärke des inaktivierenden Faktors stark mit der Temperatur, so dass er immer vollständiger und schneller die optisch aktiven Oxynitrilmoleküle umwandelt, die während der Einwirkung des Emulsinkatalysators entstehen."

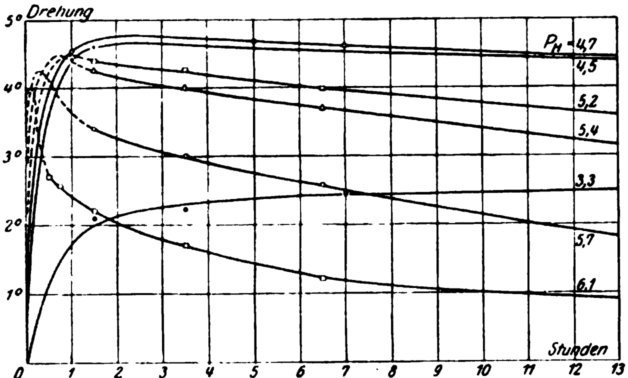
Je geringer der Säuregrad der Lösung ist (je grösser also die pH-Werte sind), desto rascher nimmt die Ausbildung der optischen Aktivität ab. In einer fast neutralen Lösung findet sie augenscheinlich kaum die Zeit, sich auszubilden, bevor sie wieder verschwunden ist.

Der Zusammenhang zwischen Inaktivierungsgeschwindigkeit und Azidität ergibt sich aus folgenden Zahlen:

[1]) Leider ist das von Rosenthaler beigebrachte Versuchsmaterial oft wenig vollständig und dies macht eine Beurteilung der darin enthaltenen Tatsachen schwierig. Zu dem hier besprochenen Punkt gibt Rosenthaler ein reichlicheres Zahlenmaterial, welches deswegen hier mitgeteilt sei (Biochem. Zs 50, 490).

Bezeichnung des Präparates	Synthetischer Versuch: Drehung (Grade) des d-Benzaldehydcyanhydrins nach				Nitrilspaltung: Drehung (Grade) des l-Benzaldehydcyanhydrins
	2,5 St.	5 St.	12 St.	24 St.	
Emulsin Merck	+ 5,10	+ 5,08	+ 4,80	—	— 1,18
„ Schuchardt. . .	+ 3,29	+ 3,45	+ 3,37	—	— 0,40
Enzympräparat aus					
bitteren Mandeln . . .	+ 3,82	+ 4,42	+ 4,04	—	— 0,15
Äpfelkernen	+ 4,96	+ 5,24	+ 4,66	—	—
Kirschkernen	+ 5,08	+ 5,14	+ 4,88	—	— 0,95
Aprikosenkernen . . .	+ 0,69	+ 0,67	+ 0,63	—	0 (auch nach Verseifung)
süssen Aprikosenkernen	+ 5,40	+ 5,32	+ 4,78	—	— 0,15
Pfirsichkernen	+ 4,47	+ 4,44	+ 4,27	—	Spuren (nach Verseifung + 0,5)
Zwetschgenkernen . .	+ 1,38	+ 1,42	+ 1,96	+ 1,47	Spuren (nach Verseifung + 0,16)
Holzbirnenkernen . . .	+ 3,06	+ 2,90	+ 2,82	—	— 0,65

pH =	3,3	4,5	4,7	5,2	5,4	5,7	6,1
Mittel $k' \cdot 10^3$ =	sehr klein	1,6	2,3	8,1	11,8	23,2	63,3



Abnehmen der optischen Aktivität mit der Zeit bei verschiedenen Aciditäten, bei Anwesenheit von Emulsin

Fig. 41.

In der Fig. 42 ist diese Beziehung graphisch dargestellt. Die untere Kurve ist der 1. Mitteilung von Nordefeldt (Biochem. Zs 118) entnommen.

Nordefeldt hat auch noch erwogen, ob die beobachtete optische Inaktivierung mit einer nach der Gleichung

$$C_6H_5 \cdot CH\begin{matrix} \diagup OH \\ \diagdown CN \end{matrix} + 2\,H_2O \rightleftarrows C_6H_5 \cdot CH\begin{matrix} \diagup OH \\ \diagdown CO_2NH_4 \end{matrix}$$

verlaufenden Hydrolyse und Bildung von Mandelsäure zusammenhängen kann. — Hierbei würde die Rechtsdrehung der Flüssigkeit immer mehr abnehmen, weil aus rechtsdrehendem Oxynitril, wie bekannt, linksdrehende Mandelsäure gebildet wird. Da aber der Zahlenwert der spezifischen Drehung bei dieser Mandelsäure (etwa — 156°, Lewkowitsch) vielmals grösser ist als beim Oxynitril (etwa + 14°, Feist) sollte zwar die Mischung nach einiger Zeit inaktiv, aber später immer stärker linksdrehend werden.

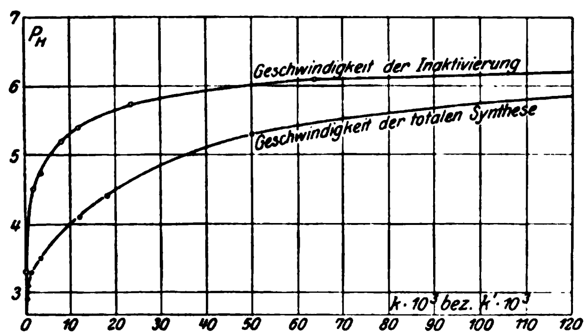


Fig. 42.

Anhaltspunkte für das Auftreten von Mandelsäure unter den Bedingungen der oben erwähnten Versuche hat Nordefeldt jedoch nicht gefunden. Demgemäss scheint auch sein Schluss berechtigt, dass es sich hier um eine Racemisierung in inaktives Oxynitril handelt.

Für kleine Emulsinmengen ist die nach einer gewissen Zeit eintretende optische Aktivität des Substrats der Emulsinmenge proportional. Das wird aus folgenden Zahlen ersichtlich:

Substrat = 14,1 ccm HCN (1,4 N, in 96 %igem Alkohol gelöst) + 2,09 g C_6H_5CHO + 10 ccm Azetatpuffer (1 N, in 47 %igem Alkohol gelöst, pH = 4,4),

ccm Emulsinlösung	5	7	10	12	15
Drehung nach 8 Stunden	0,3	0,5	0,75	0,90	1,15

Bei Annäherung an das Maximum der optischen Aktivität wird natürlich die absolute Wirkung weiterer Emulsinmengen kleiner, wie die folgende Figur 43 zeigt.

Temperatureinfluss auf die Emulsinwirkung. Stabilität des asymmetrisch wirksamen Katalysators.

Krieble und Wieland[1]) fanden bei ihrer Untersuchung mit einem Präparate aus Pfirsichblättern, dass je nach der Temperatur die totale oder die asymmetrische Synthese vorherrschend wurde, und zwar letztere bei 0°, erstere bei 35°.

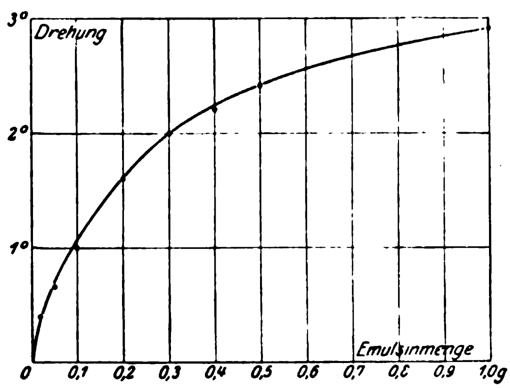


Fig. 43.

Nordefeldt gibt Versuche mit Mandelemulsin an.

Einige Fläschchen wurden mit je 10 ccm einer Emulsinlösung (4,09 % Trockensubstanz, pH = 5,9) beschickt und blieben während einer Stunde bei konstanter Temperatur, wonach sie rasch bis Zimmertemperatur abgekühlt wurden. Jetzt wird zu den mehr oder weniger koagulierten Lösungen als Puffer 10 ccm Azetat (1 N, in 47 %igem Alkohol gelöst) von pH = 5,0, darauf 15 ccm HCN (1,34 N, in 96 %igem Alkohol gelöst) und 2,13 g C_6H_5CHO zugesetzt. Nach einer Stunde bei 18° wurde filtriert. 2 dm-Rohr.

Temperatur	40°		50°		60°			70°		73°		76°		78°		80°	
Stunden	2	6	2	25	2	3	25	2	6	2	6	2	6	2	6	2	25
Drehung in Graden . .	3,00	3,00	2,95	2,35	2,65	2,85	2,00	2,30	2,40	1,75	1,75	0,45	0,45	0,25	0,25	0	0

„Zwischen 70° und 80° wird also die hier wirksame Substanz schnell inaktiviert, um nach einer Stunde Erhitzen bis 80° in Bezug auf ihr Vermögen optisch aktives Oxynitril zu bilden, ganz inaktiv zu werden. Dies gilt wenigstens für pH = ca. 5,9, obgleich es möglich ist, dass in neutraler salzhaltiger oder schwach alkalischer Lösung, wo die Koagulierung nicht so leicht stattfindet, die Aktivität auch nach stärkerem Erhitzen weiter bestehen kann.“

Nitrilsynthese durch nichterhitztes und durch erhitztes Emulsin.

Versuch 12: Emulsinlösung = 1 g Emulsin + 100 ccm Wasser, filtriert. Hiervon 1 Teil inaktiviert durch 1 Stunde Erhitzung bis zu 100° und Filtrierung. Reaktionsgemisch: 4,53 ccm

[1]) Krieble und Wieland, Jl Amer. Chem. Soc. 43, 164; 1921. — Siehe auch Krieble, ebenda 35, 1643; 1913.

HCN (2,06 N) + 1,0 g C_6H_5CHO + 4,53 ccm von bzw. aktiver oder inaktiver Emulsinlösung oder Wasser. Temp. 17°.

Nichterhitztes Emulsin.				Erhitztes Emulsin.				Ohne Emulsin.			
Stunden	Drehung in Graden	HCN	$k \cdot 10^3$	Stunden	Drehung in Graden	HCN	$k \cdot 10^3$	Stunden	Drehung in Graden	HCN	$k \cdot 10^3$
2	0,70	46,1		2	—	40,3		2	—	32,0	
			1,8				0,9				0,6
4	0,82	54,9		4	—	46,1		4	—	37,4	
			0,8				0,5				0,2
6	0,80	57,8		6	—	49,0		6	—	38,8	
			0,5				0,2				0,1
19	0,76	67,5		19	—	55,3		19	—	42,2	
											0,2

Eine auf 100° erhitzte (und filtrierte) Emulsinlösung, die keine optische Aktivität des Oxynitrils erzeugt, bewirkt also noch eine Steigerung der totalen Synthesegeschwindigkeit. Diese Wirkung ist nicht als enzymatisch zu betrachten, sondern hängt von dem Gehalt säurebindender Proteinsubstanz, die in der Lösung noch zurückbleibt, ab. Als Säure kommt hier Benzoesäure (aus dem Benzaldehyd stammend) in Frage.

Nordefeldt fasst seine experimentellen Ergebnisse sachgemäss folgendermassen zusammen (Biochem. Zs 131, 409).

„Die Schnelligkeit, womit die optische Aktivität ausgebildet wird, wird augenscheinlich von der totalen Synthesegeschwindigkeit bestimmt, welche ihrerseits durch die Azidität reguliert wird. Indessen wirkt noch ein Faktor auf die optische Aktivität ein, nämlich die intramolekulare Umlagerungsgeschwindigkeit, wodurch schliesslich eine Mischung gleich vieler rechts- und linksdrehender Moleküle ausgebildet wird. Die Geschwindigkeit dieser razemisierenden Umlagerung, die in dem ganzen untersuchten Aziditätsgebiet die Synthesegeschwindigkeit nicht erreicht, scheint mit steigendem pH und mit steigender Temperatur zu steigen, wodurch die optische Aktivität schnell abnimmt. In völlig neutraler Lösung scheint die Geschwindigkeit der Inaktivierung dieselbe Höhe zu erreichen wie die Synthesegeschwindigkeit, d. h. beide werden unmessbar gross."

„Das gewonnene d-Oxynitril ist labil, und die Drehung der Lösung nimmt von selbst ab, ohne Mitwirkung eines Enzyms oder eines anderen Katalysators. Über die Geschwindigkeit, mit der die Drehung abnimmt, ist folgendes ermittelt worden:

1. Sie steigt mit einem Temperaturkoeffizienten $k_{t+10} : k_t =$ ca. 3,2.
2. Sie nimmt mit steigender Azidität innerhalb des Gebietes pH = 3 bis 6,5 ab.
3 Sie erreicht die Höhe der totalen Synthesegeschwindigkeit erst im Neutralpunkt, wo beide unendlich gross werden und wo die optische Aktivität ebenso rasch verschwindet, wie sie entsteht."

Man kann also sagen, dass die symmetrische Oxynitrilbildung als nicht enzymatische Reaktion nunmehr im wesentlichen aufgeklärt ist. Dagegen lässt sich das Ansteigen und Abfallen der Drehung bzw. der Asymmetrie auf Grund der vorliegenden Daten noch nicht in einfacher Weise restlos beschreiben.

Über nicht-enzymatische, asymmetrisch-katalytische Wirkungen.

Wie Fischer[1]) schon 1898 betont hat, ist die Spezifität der Enzyme optischen Antipoden gegenüber darauf zurückzuführen, dass sie als asymmetrisch gebaute Katalysatoren[2]) wirken; man wird also nicht zu erwarten haben, dass die asymmetrische Katalyse auf einer besonderen Fähigkeit der Enzyme beruht, sondern dass eine solche asymmetrische Wirkung auch durch nicht enzymatische Katalysatoren bekannter Konstitution hervorgerufen werden kann. Fischer hat selbst einige Versuche über die katalytische Wirkung der d- und l-Formen einiger Säuren angestellt, und in ähnlichem Sinne hat Marckwald[3]) eine Verseifung von d- und l-Weinsäureester durch Nikotin vorgenommen.

Im I. Teil dieses Buches (S. 262 ff.) wurde bereits auf die Erfolge hingewiesen, welche Mc Kenzie[4]) hinsichtlich asymmetrischer Synthesen erzielt hat. Dieser Forscher geht in seinen Synthesen von symmetrischen Molekülen, Benzoylameisensäure bzw. Brenztraubensäure aus, macht dieselben durch Einführung eines optisch aktiven Radikals asymmetrisch und erreicht dadurch, dass aus dem symmetrischen Teil der Moleküle durch Reduktion statt eines racemischen Reaktionsproduktes überwiegend eine der optisch aktiven Formen entsteht.

Noch ausgesprochener ist der katalytische Charakter der asymmetrischen Reaktionsbeeinflussung bei einer von Markwald[5]) durchgeführten Synthese: Aus Methyläthylmalonsäure wird durch Erhitzen des sauren Salzes Carboxyl abgespalten und es entsteht eine Valeriansäure, welche ein „asymmetrisches Kohlenstoffatom" enthält. Nimmt man die Erhitzung der Methyläthylmalonsäure in Gegenwart von Brucin vor, so erhält man, wenn man den Brucinrest entfernt, überwiegend die eine (l-) Spiegelbildform des Reaktionsproduktes.

Einen weiteren interessanten Fall, die Zersetzung der d- und l-Kamphokarbonsäure haben Bredig und Fajans[6]) beschrieben; die bemerkenswerten theoretischen Darlegungen von Fajans[7]) sind bereits im I. Teil (S. 269 ff.) referiert worden.

---

1) E. Fischer, H. 26, 83; 1898.

2) Auch hier sei nochmals auf die ausgezeichneten Untersuchungen von Dakin (Jl of Physiol. 30 u. 32; 1903—1905) verwiesen.

3) Marckwald, Chem. Ber. 21, 723; 1898.

4) Mc Kenzie, Jl Chem. Soc. 85, 1249; 1904. — 87, 1373; 1905. — 89, 365; 1906.

5) Marckwald, Chem. Ber. 37, 349, 1368; 1904.

6) Bredig und Fajans, Chem. Ber. 41, 752; 1908.

7) Fajans, Zs f. physik. Chem. 73, 25; 1910.

Besonders ist aber hier die Arbeit von Bredig und Fiske[1]) zu erwähnen, in welcher eine asymmetrische Oxynitrilbildung durch Chinin und Chinidin beschrieben wird. Wir führen hier einen der zwei von Bredig und Fiske mitgeteilten Hauptversuche ausführlich an:

Von den beiden Hauptversuchen der folgenden Tabelle ist der eine mit Chinin, der andere mit Chinidin, die Kontrollversuche (Nullversuche) sind mit Chinidin ausgeführt, der eine ohne Blausäure und der andere ohne Benzaldehyd, aber in diesen Fällen wurde an Stelle der zweiten Komponente des Cyanhydrins so viel (ca. 8 g) racemische Mandelsäure, als etwa einer gesättigten Lösung derselben entsprach, zugegeben. „Diese Nullversuche wurden ausgeführt, um zu zeigen, dass unter den gegebenen Umständen schon fertige Mandelsäure durch eventuelle Einwirkung des Alkaloids nicht aktiviert wird, und andererseits um zu zeigen, dass optisch-aktive Mandelsäure nur dann erhalten wird, wenn sich ihr Nitril erst bei Gegenwart von Alkaloid synthetisch gebildet hatte."

„Es wurden 50 ccm Benzaldehyd (also 0,5 Mol) in einem gewöhnlichen 250 ccm-Masskolben in ca. 170 ccm Chloroform gelöst, hierauf wurden 20 ccm wasserfreier Blausäure (also 0,5 Mol) zugesetzt und das Gemisch eine Stunde lang im Thermostaten bei 25° stehen gelassen; dann wurde es bis zur Marke mit Chloroform aufgefüllt und 0,5 g des Alkaloids zugegeben. Nach 24 Stunden wurde der Inhalt des Kolbens in einen grossen Schütteltrichter gegossen und mit 100 ccm einer ca. 4-normalen wässerigen Lösung von Schwefelsäure 5 Minuten tüchtig geschüttelt. Von jeder Schicht wurde dann eine Probe herausgenommen und im 2 dm-Rohr mit Natriumlicht „polarisiert" (Drehung I). Dann wurde die chloroformische Schicht nochmals mit 100 ccm der Säure behandelt und darauf die beiden Proben wie oben polarisiert (Drehung II). Die chloroformische Schicht wurde dann mit 100 ccm konzentrierter wässeriger Salzsäure bei Zimmertemperatur 1 Stunde stehen gelassen und dann das Chloroform abdestilliert. Ausser der wässerigen Schicht blieb (wenn vorhanden) noch im Kolben etwas freier Benzaldehyd zurück. In diesen beiden Schichten schieden sich beim Abkühlen reichlich Kristalle von Mandelsäure ab. Um aber eine eventuelle Pasteursche Kristallisationstrennung zu vermeiden, wurden zunächst wieder alle Kristalle durch Zusatz von Wasser gelöst, erst dann wurde die wässerige Schicht von dem Benzaldehyd getrennt und letzterer mit Wasser mehrmals ausgewaschen, um alle eventuell vorhandene Mandelsäure daraus zu entfernen. Die wässerige Schicht samt allen Waschwässern wurde dann auf 500 ccm ergänzt und in einem 4 dm-Rohr polarisiert (Drehung III). (Die Nullversuche wurden von hier ab nicht weitergeführt.) Die Lösung wurde dann etwas eingedampft, mit Natronlauge bis zur alkalischen Reaktion versetzt, das Ganze nochmals zu 500 ccm ergänzt und mit 50 ccm Benzol ausgeschüttelt. Der benzolische Auszug wurde in einem 2 dm-Rohr und die wässerige alkalische Lösung selbst in einem 4 dm-Rohr polarisiert (Drehung IV und V).

	Drehung I		Drehung II		Drehung III	Drehung IV	Drehung V
	Chloroformschicht	Wässerige Schicht	Chloroformschicht	Wässerige Schicht			
Nullversuche:							
1. Ohne Blausäure . .	0,00°	+ 2,80°	0,00°	0,00°	— 0,01°	—	—
2. Ohne Benzaldehyd	— 0,02°	+ 2,50°	+ 0,01°	— 0,01°	— 0,01°	—	—
Hauptversuche:							
3. Mit Chinin	+ 0,23°	— 2,24°	+ 0,32°	— 0,18°	— 0,81°	— 0,01°	— 0,60°
4. Mit Chinidin	— 0,27°	+ 2,43°	— 0,38°	— 0,33°	+ 0,92°	0,00°	+ 0,71°

Wie man schon durch den blossen Augenschein erkennen konnte, beschleunigen geringe Mengen der Alkaloide die Addition der Blausäure an den Benzaldehyd ausserordentlich stark. Da diese Reaktion nämlich mit einer starken

[1]) Bredig und Fiske, Biochem. Zs 46, 7; 1912.

Kontraktion verbunden ist, konnte man diese letztere in derselben Zeit an den mit Alkaloiden versetzten Versuchen sehr deutlich wahrnehmen, während in den Nullversuchen eine solche Kontraktion nicht sichtbar war.“

„Aus der Tabelle geht hervor, dass die chloroformische Schicht in den Nullversuchen nach Ausschüttelung des Alkaloids mittels Schwefelsäure optisch inaktiv war, während in den Hauptversuchen, in denen sich Cyanhydrin gebildet hatte, diese chloroformischen Schichten eine erhebliche Drehung zeigten; und zwar zeigte sich hier bei Anwendung des linksdrehenden Chinins als Katalysator eine Rechtsdrehung, bei Anwendung des rechtsdrehenden Chinidins als Katalysator eine Linksdrehung.“

Die asymmetrische Oxynitrilsynthese von Fajans wurde von Bayliss[1]) experimentell bestätigt, welcher gleichfalls fand, dass der verwendete Katalysator auch bei Dissoziation des inaktiven Oxynitrils die Reaktionsgeschwindigkeit desselben Isomeren beschleunigt wie bei Synthese.

Auch aus diesen Versuchen geht also deutlich hervor, dass zwischen den asymmetrisch-katalytischen Wirkungen z. B. eines Alkaloids und denen eines Enzyms prinzipielle Unterschiede nicht bestehen. Nur die quantitative Durcharbeitung eines solchen Falles steht noch aus. Bezüglich der Oxynitrilbildung fehlt zunächst die genaue Kenntnis der Dissoziationskonstanten dieses Stoffes als Säure.

Anti-Stoffe nach subkutaner Emulsin-Injektion.

Da in diesem Kapitel die Amygdalinspaltung besonders behandelt worden ist, so müssen auch diejenigen Versuche erwähnt werden, bei welchen eine Beeinflussung der Amygdalinspaltung durch Serum nach subkutaner Injektion von Emulsin beobachtet wurde.

Im Anschluss an die Versuche von Beitzke und Neuberg (s. I. Tl. S.277) hat sein Schüler Ohta Kaninchen mit Emulsin Kahlbaum vorbehandelt (8 Injektionen von je 0,1 g Emulsinpräparat von „enormem Spaltungsvermögen gegen Amygdalin“). Bezüglich der spaltenden Wirkung (bestimmt wurde die aus Amygdalin gespaltene Glukose) kommt Ohta zum Resultat, dass an der hemmenden Wirkung des Imunserums im Vergleich mit Normalserum kein Zweifel bestehen kann.

Immerhin erscheint es nicht ausgeschlossen, dass die Unterschiede zwischen Immunserum und Normalserum, welche Otha[2]) gefunden hat, auf Verschiedenheiten der Azidität zurückzuführen sind, entsprechend einer früher von Bayliss[3]) geäusserten Vermutung.

[1]) Bayliss, Jl of Physiol. 46, 236; 1913.
[2]) Ohta, Biochem. Zs 54, 430; 1913.
[3]) Bayliss, Jl of Physiol. 43, 455; 1912.

E. Methoden zur Verfolgung der Spaltung der Nitrilglukoside.

Es kommen hier drei Methoden in Betracht:

1. Die polarimetrische Methode (bei Anwendung der optisch-aktiven Formen) ist zur Messung der Amygdalin-Hydrolyse zuweilen in Anwendung gekommen. Selbst unter Beobachtung der erforderlichen Massnahmen zur Aufhebung der Mutarotation erscheint diese Methode hier nicht empfehlenswert, da die Berechnung der einzelnen Substanzkonzentrationen aus der Gesamtdrehung der Lösung wegen des gleichzeitigen Ablaufes mehrerer Teilreaktionen unsicher wird.

2. Die Bestimmung der gebildeten Glukose nach einer geeigneten Reduktionsmethode. Durch die anwesende Blausäure wird die Methode von Pavy-Kumagawa-Suto unanwendbar, wie Caldwell u. Courtauld[1]) erkannt haben.

H. E. Armstrong, E. F. Armstrong u. Horton (Proc. Roy. Soc. 80) haben die durch Schwefelsäurezusatz inaktivierten Proben mit Pottasche versetzt, die Blausäure durch ½stündige Destillation mit Wasserdampf vertrieben und die Glukose nach einem Reduktionsverfahren von Brown, Morris und Miller bestimmt.

Willstätter und Csányi[2]) ziehen es vor „aus der schwefelsauren Flüssigkeit, 1—2 ccm 10%iger Schwefelsäure auf 20 ccm enthaltend, die Blausäure mit Wasserdampf abzutrennen, was in 30 Min. vollständig gelang". Amygdalin wird durch die Dampfdestillation nicht messbar hydrolysiert. Hierauf bestimmen sie den Zucker nach Sonntag[3]) und Bertrand[4]).

3. Auld[5]) hat die Amygdalinspaltung durch die entbundene Blausäure gemessen, wobei natürlich nur eine der Teilreaktionen ermittelt wird. Die Blausäurebestimmung geschah nicht durch Titration mit Silbernitrat, sondern mit einer von Dunstan und Henry[6]) beschriebenen titrimetrischen Methode, welche darin besteht, dass Blausäure in Gegenwart von Natriumbikarbonat mit einer titrierten Jodlösung nach der Gleichung umgesetzt wird:

$$HCN + J_2 = CNJ + HJ.$$

Berechnung der enzymatischen Wirksamkeit.

Bei der Amygdalinspaltung handelt es sich nicht um eine einfache Reaktion, sondern um die gleichzeitige Wirkung zweier Enzyme, nämlich der Amygdalase und der „Prunase", evt. auch noch einer Oxynitrilase; Reaktions-

[1]) Caldwell u. Courtauld, Jl Chem. Soc. 91, 666; 1907.
[2]) Willstätter u. Csányi, H. 117, 172 und zwar 177; 1921.
[3]) Sonntag, Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamt, 19, 447; 1903.
[4]) Bertrand, Bull. Soc. Chim. (3) 35, 1285; 1906.
[5]) Auld, Jl Chem. Soc. 93, 1251 und zwar 1263; 1908.
[6]) Dunstan u. Henry, Proc. Roy. Soc. 72, 287; 1903.

koeffizienten 1. Ordnung, $k = {}^1/_t \log a/a{-}x$, können also hier nicht gemessen werden.

Willstätter und Csányi[1]) bestimmen für ihre Präparate den „Zeitwert", d. h. sie messen die Zeit, welche zur 50%igen Spaltung von 0,10 g Amygdalin (20 ccm Lösung; 1 mg Emulsin; 30°) erforderlich ist. Aus den jeweils beobachteten Spaltungsgraden ermitteln sie durch die in Fig. 36 S. 247 mitgeteilte Kurve die der 50%igen Spaltung entsprechenden Zeiten. (Dabei ist die Abspaltung von 2 Mol. Glukose als theoretischer Wert angenommen.)

Zur Bestimmung der Enzymausbeute wenden die genannten Forscher einen Menge-Zeit-Quotienten an, der Enzymmenge proportional, additiv, nämlich den Quotienten des emulsinhaltigen Materials in mg und seiner Wirkungszeit. Z. B. lieferten 20 g Mandeln vom Zeitwert 480 (M:Z = 41,7) 0,55 g Enzympräparat (Emulsin) vom Zeitwert 18 (M:Z = 30,6); Ausbeute 73,5%.

Zur Bestimmung der Bildung und Spaltung des Benzoxynitrils kann die Blausäure nach Volhardt durch eine Silberlösung titrimetisch bestimmt werden.

[1]) Willstätter u. Csányi, H. 117, 172 und zwar 176; 1921.

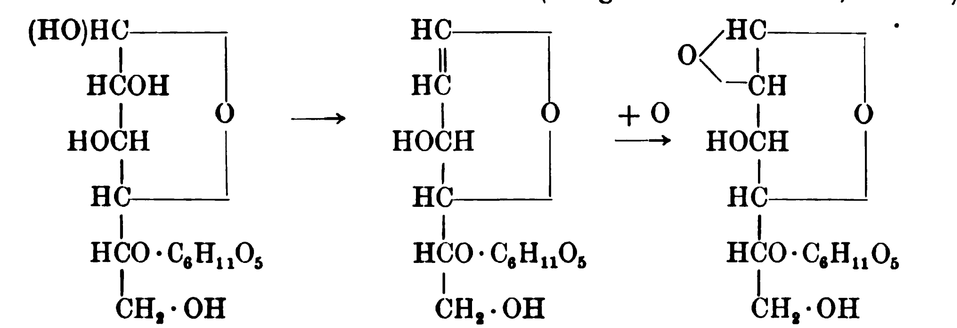
Kapitel 8.

Glukosido-β-Glukosidasen.

Die in diesem Kapitel behandelten Biosen werden von Mandelemulsin gespalten. Das deutet im allgemeinen auf die Zugehörigkeit zu den β-Glukosiden. Ein sicheres Kriterium ist dieses Verhalten zu Emulsin aber, wie schon Fischer hervorhob, nicht. Auch die Spezifität der Glukosido-β-Glukosidasen steht noch nicht fest.

A. Cellobiase.

Substrat: Die Cellobiose (Cellose) ist 1901 von H. Skraup und J. König[1]) dargestellt worden. Mikrokristallinisch, Schmp. 225°. $[\alpha]_D^{19,5} = +33,87^0$ (für c = 10)[2]). $[\alpha]_D^{16,5} = +33,5^0$ (für c = 1,05)[3]). Reduktionsvermögen nach Bertrand: 1,38 mg Cu per mg Cellobiose. Die Konstitution ist 1921 durch die Untersuchungen von Haworth[4]), Bergmann[5]) und Karrer[6]) und ihrer Mitarbeiter im wesentlichen aufgeklärt worden. Da die Kenntnis der Konstitution und Konfiguration für die weitere Erforschung der hierher gehörenden Enzymwirkungen grundlegend ist, teilen wir die hier in Betracht kommenden Formeln mit, und zwar sowohl diejenige der Cellobiose als des Cellobials und der daraus entstehenden 5-Glukosidomannose (Bergmann u. Schotte, l. c. 1567).



Cellobiose = 5-Glukosido-glukose   Cellobial   5 Glukosido-1.2-Anhydromannose

[1]) Skraup u. König, Chem. Ber. 34, 1115; 1901. — Siehe auch Maquenne und Goodwin, Bull. Soc. Chim. Paris (3) 31, 854; 1903.

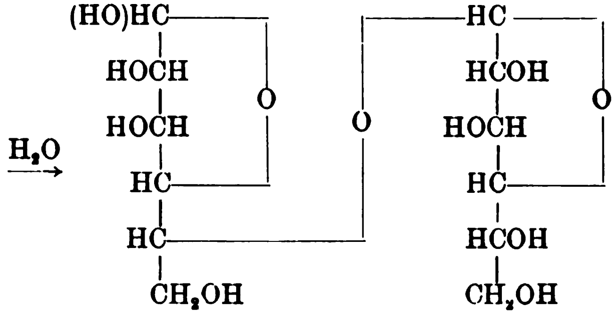
[2]) Bertrand u. Holderer, Bull. Soc. Chim. France (4) 7, 177; 1910.

[3]) Willstätter u. Zechmeister, Chem. Ber. 46, 2401, und zwar 2408; 1913.

[4]) Haworth und Hirst, Jl Chem. Soc. 119, 193; 1921.

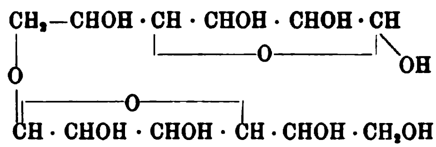
[5]) Bergmann u. Schotte, Chem. Ber. 54, 440 u. 1564; 1921. — Bergmann, Naturwiss. 9, 308; 1921.

[6]) Karrer u. Widmer, Helv. 4, 263, 295; 1921.

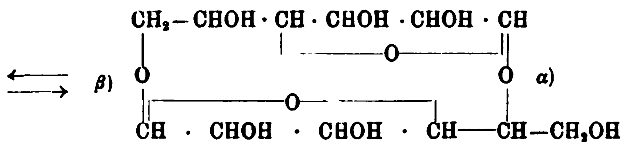


5-Glukosido-Mannose.

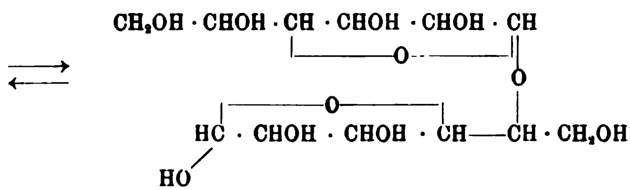
Im Anschluss an diese Formeln seien noch die von Karrer[1]) hervorgehobenen nahen Beziehungen erwähnt, welche zwischen dem Anhydrozucker Cellosan und einerseits der Cellobiose, andererseits der Maltose (oder Isomaltose) bestehen.



Maltose.



Cellosan.



Cellobiose.

Je nachdem, an welcher der beiden glukosidischen Bindungen die Spaltung erfolgt, muss sich aus Cellosan Cellobiose oder Maltose (bzw. Isomaltose) bilden können.

Dabei ist allerdings zu bemerken, dass man bisher Maltose bei der Hydrolyse der Cellulose nicht hat erhalten können; Karrer führt dies auf die Säureempfindlichkeit der Maltose zurück. Andererseits haben sich nur 50—60% Cellobiose in der Cellulose nachweisen lassen[2]). Immerhin bleibt dann noch aufzuklären, ob und wann der Cellosanring, der eine α- und eine β-Bindung enthalten soll, von α-Enzymen angegriffen wird. Auch über die evtl. Abspaltung von Cellobiose aus Stärke liegen noch keine Anhaltspunkte vor. Mit Mandelemulsin konnte im hiesigen Laboratorium in keinem Stadium des Stärkeabbaues eine Bildung von Cellobiose erzielt werden[3]).

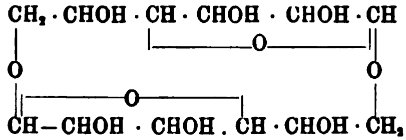
---

[1]) Karrer u. Smirnoff, Helv. 5, 187; 1922.

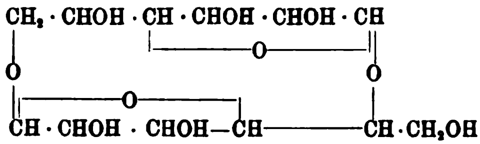
[2]) Karrer u. Widmer, Helv. 4, 174; 1921. — Freudenberg, Chem. Ber. 54, 767; 1921.

[3]) Siehe hierzu auch v. Friedrichs, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, 5, Nr. 2—4; 1913.

Den Zusammenhang zwischen Diamylose und Cellosan stellt Karrer nunmehr durch folgende Formelbilder dar:



Diamylose.

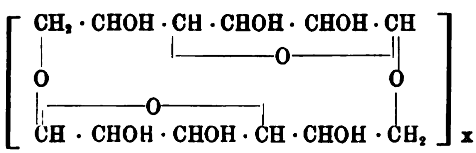


Cellosan.

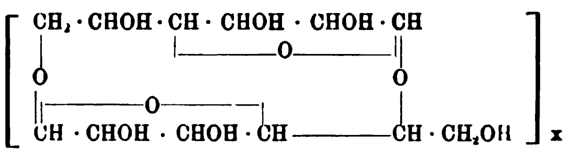
Die Formel der Diamylose (vgl. auch S. 84; S. 85 ist eine ältere Formel von Pringsheim angegeben) zeigt, warum aus dieser Biose und aus Stärke 100 % Maltose erhalten werden können; an welcher der beiden glukosidischen Bindungen nämlich auch Spaltung vor sich geht, es muss in beiden Fällen Maltose entstehen.

H. Pringsheim [1]) hat zuerst die Vermutung ausgesprochen, dass Cellulose polymere Anhydrocellobiose ist, eine Ansicht, welche auch Karrer [2]) vertritt.

Die Formeln der Stärke und der Cellulose schreibt also Karrer jetzt, ohne Berücksichtigung der Konfiguration, in folgender Art:



Stärke



Cellulose

Karrer u. Smirnoff betonen, dass man hier „einem ungemein klaren und in seiner Einfachheit wunderbaren Prinzip der pflanzlichen Kohlenhydratsynthese gegenübersteht".

„Der Grundkörper der Stärke (und des Glykogens) und der Cellulose ist die Maltose. Durch Anhydrisierung zwischen den Hydroxylen 1 und 12 der Maltosemolekel wird die Diamylose, der Grundkörper der Stärke, gebildet; durch Anhydrisierung zwischen den OH-Gruppen 1 und 11 bildet sich das Cellosan, das Grundglied der Cellulose. Ein polymerer Zustand der Diamylose ist die Stärke, eine polymere Form des Cellosans die Cellulose. Wie

[1]) H. Pringsheim, Cellulosechemie 2, 57; 1921.

[2]) Karrer, Cellulosechemie 2, 125; 1921.

durch eine einfache Umstellung von einzelnen Aminosäuren in den Eiweissmolekeln vom Organismus Eiweissstoffe erzeugt werden, die dem Angriff der Fermente nicht mehr unterliegen, so dass sie als Gerüst-Eiweissstoffe Verwendung finden können, so liegt es im Ermessen der Pflanze, durch anders verlaufende Anhydrisierung der Maltose statt Reservestoffe (Stärke, Glykogen) Gerüstsubstanz, Cellulose, zu erzeugen." — Dass in dieser Darstellung indessen noch manches Hypothetisch eenthalten ist, hat neuerdings Pringsheim hervorgehoben[1]).

Vorkommen der Cellobiase[2]). Die Cellobiose wird durch einen Bestandteil des Mandelemulsins gespalten. Bertrand gibt ferner andere Fruchtkerne (Aprikosen) und Getreidekörner als Fundorte einer Cellobiase an. Bertrand und Holderer[3]) sowie E. Fischer und Zemplén[4]) haben ein diese Biose angreifendes Enzym in Aspergillus niger und in Kefirkörnern festgestellt. In Russula hat sie Bertrand nicht gefunden. Bezüglich des Vorkommens in niederen Pilzen sei noch besonders auf die Arbeiten von H. Pringsheim und Zemplén[5]) verwiesen, welche mit Presssäften von Aspergillus Wentii (besonders enzymreich), Allescheria Gayonii, Penicillium purpurogenum, Mucor mucedo reichliche Spaltung von Cellobiose erzielten (siehe Tab., l. c. S. 382). Später hat H. Pringsheim[6]) die Wirkung einer Cellobiase in denitrifizierenden Bakterien, in Wasserstoffgärungsbakterien und in thermophilen Bakterien nachgewiesen.

Über die Besonderheit der Cellobiase und ihre Abgrenzung und Unterscheidung von Alkyl- und Phenyl-Glukosidasen und anderen Enzymen besitzen wir noch nicht genug experimentelle Unterlagen. Bertrand hat sich mit Holderer (Bull. 7, l. c.) sowie mit Compton[7]) auf Grund eigener Versuche nachdrücklich für die Existenz einer spezifischen Cellobiase ausgesprochen; die Vergleiche betreffen Laktase und Emulsin, und man wird den genannten Forschern bezüglich der Verschiedenheit der Cellobiase von Laktase zustimmen können; bezgl. Emulsin ist die Entscheidung wegen der zahlreichen Komponenten schwieriger.

Sichergestellt ist, dass Cellobiose durch Hefenenzyme nicht angegriffen wird, also kann die Cellobiase weder mit Maltase noch mit Trehalase, noch mit Amygdalase identisch sein.

Darstellung. Aus Aspergillus niger: Der Pilz wurde auf einer Asparagin-haltigen Nährlösung gezüchtet, dann nach der Vorschrift von Bour-

[1]) Pringsheim, Zs angew. Chem. 35, 345; 1922.

[2]) Was das Vorkommen in tierischen Organen und Sekreten betrifft, wie Pankreas, Darm, Pferdeserum (Porcher, Soc. Biol. 68) so bleibt noch zu untersuchen, inwieweit Bakterien oder Leukozyten an den beobachteten Cellobiosespaltungen beteiligt sind.

[3]) Bertrand u. Holderer, C. r. 149, 1385; 1909. — 150, 230; 1910. — Siehe auch Holderer, Woch. f. Brau. 26, 380; 1909.

[4]) Fischer u. Zemplén, Lieb. Ann. 365, 1; 1909. — 372, 254; 1910.

[5]) H. Pringsheim u. Zemplén, H. 62, 367; 1909.

[6]) H. Pringsheim, H. 78, 266; 1912.

[7]) Bertrand u. Compton, C. r. 151, 402; 1910. — Ann. Inst. Pasteur, 24, 931; 1910.

quelot[1]) getrocknet. Hierauf wurden 2 g des zerriebenen Materials mit 20 ccm Wasser 24 Stunden bei 37° ausgelaugt. Mit 10 ccm dieser Lösung wurden 0,5 g Cellobiose unter Zusatz von Toluol 84 Stunden bei 37° stehen gelassen, dann war die Biose zum grössten Teil gespalten.

Aus Kefirkörnern: 25 g gewaschene Kefirkörner werden mit 150 ccm dest. Wassers und 2,5 ccm Toluol bei 20°—23° während 48 Stunden unter zeitweisem Umschütteln stehen gelassen. Die Hydrolyse der Cellobiose erfolgt nur langsam.

Aus niedrigen Pilzen durch Presssäfte: Pringsheim und Zemplén, l. c.

Wirkungsbedingungen. Aus Bertrands und Comptons[2]) Angaben lässt sich entnehmen, dass das Aziditätsoptimum bei etwa pH = 6 liegt.

Für Extraktion und Filtration durch Ton soll nach Bertrand und Holderer (Bull. Soc. Chim. (4) 7, 180 u. ff.) die Azidität sehr wesentlich sein. Natürlich sind hier wie bei der Saccharase die Verunreinigungen ausschlaggebend.

Einfluss der Temperatur: Auch bezüglich der Temperatur liegt eine Untersuchung von Bertrand und Compton[3]) vor, welche mit Extrakt aus süssen Mandeln angestellt ist; die von ihnen angegebenen Kurven zeigen ein deutliches Maximum der Wirksamkeit bei etwa 46°.

3 Minuten langes Erhitzen auf 75°—77° hat das Enzym zerstört. Bereits bei 67° ist die Bakterien-Cellobiase genügend schnell inaktiviert, um den enzymatischen Abbau durch gewisse Bakterien so leiten zu können, dass die Cellulase (welche Cellobiose bildet) noch wirksam bleibt, während ein weiterer Abbau der entstandenen Biose verhindert wird. Dadurch ist es H. Pringsheim gelungen, wichtige Aufklärungen über die Cellulosespaltung zu erhalten (vgl. S. 67).

Synthese. Wie schon im I. Teil erwähnt, hat Bourquelot zusammen mit Bridel und Aubry mit Hilfe von Emulsin Glukose zu Cellobiose synthetisieren können. Gleichzeitig wird Gentiobiose gebildet. Beim ersten Versuch[4]) wurde Glykol als Lösungsmittel verwendet; dabei entstand ausserdem noch Glykolmonoglukosid und Glykoldiglukosid. Bei weiteren Versuchen in wässriger Lösung[5]) war der Nachweis der Cellobiose neben Gentiobiose weniger scharf.

Cellobioson.

Bemerkenswert ist, dass auch das Cellobioson durch Emulsin gespalten wird. E. Fischer und Zemplén[6]), welche diesen Körper dargestellt haben, geben darüber folgenden Versuch an:

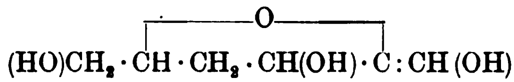
---

[1]) Bourquelot, C. r. 116, 826; 1893.
[2]) Bertrand und Compton, C. r. 153, 360; 1911.
[3]) Bertrand und Compton, Bull. Soc. Chim. France (4) 9, 100; 1911.
[4]) Bourquelot und Bridel, C. r. 168, 1016; 1919.
[5]) Bourquelot, Bridel und Aubry, Jl de Pharm et de Chim. (7) 21, 129; 1920.
[6]) E. Fischer und Zemplén, Lieb. Ann. 365, 1; 1909.

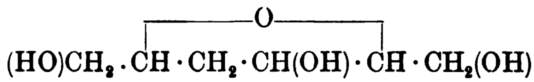
Eine Lösung von 1 g Cellobiose in 8 ccm Wasser blieb mit 0,5 g Emulsin 20 Stunden bei 36° stehen. Nach dem Aufkochen mit wenig Na Ac wurde filtriert. Die Flüssigkeit enthielt jetzt Glukoson und Traubenzucker, denn sie gab in der Kälte auf Zusatz von salzsaurem Phenylhydrazin und Na Ac sehr bald einen reichlichen Niederschlag von Phenylgukosazon.

Hydrocellobial.

Das Hydrocellobial, $C_{12}H_{22}O_9$ haben E. Fischer und K. v. Fodor[1]) aus Hexa-acetylcellobial durch Reduktion mit Platinmohr nach Willstätter und Abspaltung der Azetylgruppen mittels Baryt erhalten. „Die nahen Beziehungen zum Glucal und Hydroglucal liessen sich beweisen durch die Hydrolyse des Hydrocellobials mit Emulsin.“



Glucal.



Hydroglucal.

„Eine Lösung von 2 g Hydrocellobial in 20 ccm Wasser blieb mit 0,8 g käuflichem Emulsin und einigen Tropfen Toluol in verschlossenem Gefäss 2 Tage bei 37° und wurde dann filtriert, aufgekocht, abermals filtriert und nochmals gekocht. Um die jetzt in der Lösung in reichlicher Menge enthaltene Glukose zu entfernen, haben wir mit 0,5 g obergäriger Hefe versetzt und unter den üblichen Vorsichtsmassregeln wieder 24 Stunden bei 37° gehalten. Die von der Hefe abfiltrierte Lösung, welche jetzt kaum noch reduzierte, wurde unter vermindertem Druck verdampft, der Rückstand mit Alkohol ausgekocht, das alkoholische Filtrat wieder verdampft und der Rückstand mehrmals mit Essigäther ausgekocht. Beim Verdampfen des Essigäthers blieb ein Sirup. Er wurde in sehr wenig Alkohol gelöst, bis zur beginnenden Trübung mit Petroläther versetzt und mit einem Kriställchen von Hydroglucal geimpft. Alsbald begann die Abscheidung von schön ausgebildeten Prismen.“ Dieselben schmelzen bei 85—87° und gleichen in jeder Beziehung dem Hydroglucal, $C_6H_{12}O_4$.

Über die Rolle von Glucal und Hydroglucal im pflanzlichen Organismus ist bis jetzt nichts bekannt. Eine nähere Untersuchung verdienen die enzymatische Aufspaltung und Bildung des γ- und δ-Laktonringes und des Pyronringes und die Übergänge, welche dadurch zwischen Abkömmlingen der Zuckergruppe und des Pyrons ermöglicht werden; besonders ist die Bildung des Maltols, $C_6H_6O_3$ (Peratoner; Traetta-Mosca[2]), hierbei in Betracht zu ziehen und mit derjenigen des Hydroglucals zu vergleichen.

B. Gentiobiase.

Substrat. Die von Bourquelot und Hérissey[3]) 1901 entdeckte Gentiobiose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, schmilzt bei 190—195°. Mutarotiert; $[\alpha]_D$ der α-Form $= + 39°$; der β-Form $= - 11°$; im Gleichgewicht ist $[\alpha]_D = - 9{,}6°$.

---

[1]) E. Fischer und K. v. Fodor, Chem. Ber. 47, 2057; 1914.

[2]) Traetta-Mosca, R. Acad. du Lincei 30, 324; 1921.

[3]) Bourquelot und Hérissey, C. r. 132, 571; 1900. — 135, 290, 399; 1901. — Jl de Pharm. et de Chim. (6) 16, 420; 1901.

Der Gentiobioserest ist in der Gentianose enthalten (vgl. S. 208). Zemplén[1]) hat das gut kristallisierende Octoacetat der Gentiobiose direkt aus dem Extrakt der Enzianwurzel, Radix gentianae german.[2]) gewonnen. Von Hefen wird Gentiobiose im allgemeinen nicht hydrolysiert; nur bei einer Unterhefe fanden Bourquelot und Hérissey[3]) eine schwache Spaltungsfähigkeit.

Als weiteres Substrat des gleichen Enzyms kommt auch die Gentianose selbst in Betracht, und zwar würde die Spaltung durch die Gentiobiase zwischen den beiden Glukoseresten eintreten müssen, wobei Rohrzucker entsteht:

Fruktose—Glukose—Glukose.

Bourquelot und Bridel[4]) haben auf diese Weise Gentianose durch saccharasefreies Emulsin spalten und Glukose sowie Rohrzucker isolieren können. Wie aber Bourquelot schon viel früher[5]) fand, spaltet das gleiche Emulsin die Gentianose selbst viel langsamer als die freie Gentiobiose.

Verbreitung, Wirkungsweise und Eigenart des Enzyms sind noch wenig untersucht. Nur dass es zu den β-Enzymen gehört, dürfte mit Sicherheit behauptet werden können.

Synthetische Wirkung. Bourquelot, Hérissey und Coirre[6]) ist es 1913 gelungen, die Synthese der Gentiobiose aus Glukose mittels Emulsin durchzuführen und diese Synthese, welche in der Geschichte der enzymatischen Synthesen einen hervorragenden Platz einnimmt, ist später von Zemplén (Chem. Ber. 48, l. c.) durchaus bestätigt worden[7]).

Die genannten Forscher beschreiben folgenden Versuch:

1000 ccm einer Lösung von 50 g Glukose in 100 ccm ($\alpha = +50^\circ 30'$, $l = 2$) wurden mit 5 g Emulsin und 5 g Toluol versetzt, hierauf bei 15—20° während eines Monats täglich 2—3 mal umgeschüttelt. Die Drehung fiel auf $+44^\circ 12'$.

Hierauf wurde die Lösung erhitzt, filtriert und einer Gärung durch obergärige Bierhefe unterworfen. Die gegorene, mittels $CaCO_3$ neutralisierte Lösung wurde unter vermindertem Druck ganz eingedampft. Der Rückstand wurde 3 mal mit 95%igem Alkohol und 3 mal mit 90%igem Alkohol (jedesmal mit 150 ccm) unter Rückfluss ausgekocht. Die nach Erkalten filtrierten Extrakte wurden mit Gentiobiose-Kristallen geimpft. Nach etwa 3 Wochen wurden die Flüssigkeiten dekantiert, von kristallisierten aschereichen Produkten abfiltriert und wieder mit Gentianose geimpft. Nach 6 Wochen wurden die aufs neue entstandenen Kristalle (etwa 8 g) gesammelt und aus 90%igem Alkohol umkristallisiert; sie erwiesen sich als Gentiobiose.

---

[1]) Zemplén, H. 85, 399; 1913. — Chem. Ber. 48, 233; 1915.

[2]) Gentianose kommt (neben Rohrzucker) auch in anderen Gentiana-Arten (cruciata u. purpurea) vor (Bridel, Soc. Biol. 83, 24; 1920).

[3]) Bourquelot und Hérissey, Ann. Chim. et Phys. (7) 26; 1902.

[4]) Bourquelot und Bridel, C. r. 171, 11; 1920. — Jl de Pharm. et de Chim. (7) 22, 241; 1920.

[5]) Bourquelot, Jl de Pharm. et de Chim. (6) 16; 15. Dez. 1902.

[6]) Bourquelot, Hérissey und Coirre, C. r. 157, 732; 1913. — Jl de Pharm. et de Chim. (7) 8, 441; 1913.

[7]) Siehe auch Bourquelot und Bridel, C. r. 165, 728; 1917 und 168, 253; 1919 (Glykol als Lösungsmittel).

Wie diese Synthese (und diejenigen der Alkylglukoside) zeigt, lässt sich die früher von Armstrong geäusserte Auffassung, dass die Enzyme diejenigen Stoffe bilden, zu deren Spaltung sie unfähig sind, nicht mehr aufrecht erhalten, vielmehr deuten alle sicheren Tatsachen darauf hin, dass die Enzyme von beiden Seiten her Gleichgewichte einzustellen vermögen. Bei den Biosen ist man leider über die Lage der Gleichgewichte (die sich ohne Enzym einstellen würden) nicht genügend unterrichtet (vgl. auch I. Teil S. 220 ff.).

C. Spaltung der Isomaltose.

E. Fischer[1]) erhielt bei der Einwirkung von konz. Salzsäure auf Glukose (100 g Glukose + 400 g rauch. HCl, 15 St. bei 15°) eine Biose, welche er als Isomaltose bezeichnete. Harrison[2]) fand für Isomaltose, die durch 0,7 n. HCl synthetisiert war $[\alpha]_D = +84,4°$.

Das Vorkommen der Isomaltose im tierischen und pflanzlichen Organismus ist von manchen Forschern (Pavy, Röhmann) behauptet, von anderen bestritten worden. Auch über die enzymatische Bildung der Isomaltose aus Stärke gehen die Ansichten auseinander[3]).

Durch Maltase wird Isomaltose nicht gespalten. E. F. Armstrong[4]) fand, dass Isomaltose durch Emulsin hydrolisiert wird. Damit wäre nach unseren gegenwärtigen Ansichten die Tatsache vereinbar, dass die von Croft Hill[5]) durch enzymatische Synthese erhaltene Biose Isomaltose[6]) war. Obwohl Croft Hill zu seiner Synthese Bierhefe angewandt hatte, kann sich Isomaltose gebildet haben, da, wie Henry und Auld[7]) und später Neuberg nachweisen konnten, Bierhefe auch etwas „Emulsin" (β-Glukosidase) enthält; Bayliss hat sich schon zeitig in dieser Richtung ausgesprochen.

Da nun Bourquelot, Hérissey und Coirre die Synthese der Gentiobiose unzweifelhaft gelungen ist (vgl. S. 275), so liegt die Annahme nahe, dass Gentiobiose und Isomaltose identisch sind. Dies ist aber, wie ein bemerkenswerter Versuch von Zemplén[8]) gezeigt hat, nicht der Fall. Isomaltose ist also eine besondere Glukosido-β-Glukose.

[1]) E. Fischer, Chem. Ber. 23, 3687; 1890. — 28, 3024; 1895.

[2]) Harrison, Jl Amer. Chem. Soc. 36, 586; 1914.

[3]) Durch die neueren Ergebnisse über die Konstitution der Stärke (vgl. die Stärkeformel von Karrer, S. 271) und durch die Annahme, dass in dieser Ringformel eine α- und eine β Glukosidbindung vorkommt, wäre die Bildung von Isomaltose aus Stärke theoretisch verständlich.

[4]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B. 76, 592; 1905.

[5]) Croft Hill, Jl Chem. Soc. 73, 634; 1898.

[6]) Emmerling, Chem. Ber. 34, 600 und 3810; 1901.

[7]) Henry und Auld, Proc. Roy. Soc. B. 76, 568; 1905.

[8]) Zemplén, Chem. Ber. 48, 233; 1915.

Kapitel 9.

Verhalten der Methyl-Fruktoside und -Sorboside, der Heptoside, Pentoside und Maltoside gegen Emulsin.

Die Zusammenfassung der in der Überschrift genannten Stoffe in einem besonderen Kapitel geschieht lediglich der Übersichtlichkeit wegen und aus systematischen Gründen; es soll damit nicht die Vermutung ausgesprochen werden, dass ihre Spaltungen von einem spezifischen Enzym oder einer spezifischen Enzymgruppe beschleunigt werden. Vielmehr muss man es sogar als wahrscheinlich betrachten, dass die angreifbaren Rhamnoside und β-Bioside — mit der einen oder anderen Ausnahme — ihre Spaltung und Bildung durch die entsprechenden β-Glukosidasen erfahren. Im Interesse einer kommenden Durcharbeitung der hierher gehörenden Enzymwirkungen habe ich geglaubt, wenigstens die typischen Substrate, die auf ihre enzymatische Spaltbarkeit geprüft worden sind, hier zusammenstellen zu sollen, um so mehr, als hierdurch Material gesammelt wird zur Beantwortung der Frage, welche Konstitutionseinflüsse sich bei enzymatischen Hydrolysen geltend machen.

Da über die Enzyme selbst nichts Näheres bekannt ist, so betrifft die folgende Zusammenstellung die Substrate.

A. Hexoside.

Methyl-l-Glukoside.

(E. Fischer, Chem. Ber. 28.) Sowohl die α- als die β-Form ist dargestellt. Sie werden weder von Emulsin noch von Hefeninfus angegriffen.

Methyl-Mannoside.

Methyl-d-Mannosid und Methyl-l-Mannosid (E. Fischer, Chem. Ber. 26) wird nach der verbesserten Fischerschen Methode (sehr verdünnte methylalk. Salzsäure) dargestellt[1]. In 8%iger wässeriger Lösung wurde $[\alpha]_{D}^{20} = +79{,}2^{0}$ bzw. $-79{,}4^{0}$ gefunden. Van Ekenstein nimmt an, dass hier α-Verbindungen vorliegen.

Die enzymatische Spaltung der verschiedenen Isomeren ist noch nicht hinreichend aufgeklärt. Wie Fischer (Chem. Ber. 28, 1430) schreibt, wäre es sehr erwünscht, dass noch das zweite Methyl-d-Mannosid aufgefunden würde, vielleicht ist dasselbe im Gegensatz zu der schon bekannten Verbindung durch Emulsin leicht spaltbar.

Über enzymatische Bildung eines α-Methyl-d-Mannosides siehe Hérissey, C. r. 172.

---

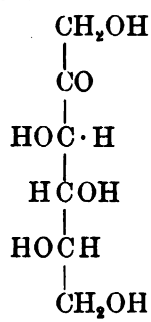
[1]) E. Fischer u. Beensch, Chem. Ber. 29, 2927; 1896. — Siehe auch Lobry de Bruyn und van Ekenstein, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas. 15, 223; 1896.

β-Methyl-Fruktosid.

Das aus einer Lösung von Fruktose in abs. Methylalkohol, der 0,5% HCl enthält, entstehende Methylfruktosid[1]) konnte von E. Fischer nicht kristallisiert erhalten werden. Es wird von verdünnten Säuren überaus leicht in Fruktose zurückverwandelt; „dieselbe Spaltung erfährt es partiell durch Hefeinfus". Es dürfte überwiegend die α-Verbindung enthalten haben. Erst Hudson und Brauns[2]) ist die Darstellung des kristallisierten β-Methyl-Fruktosides gelungen. Schmelzpunkt 119—120°. $[\alpha]_D^{20} = -172{,}1°$ (p = 10). Emulsin hydrolysiert das Glukosid nach Hudson nicht (auch nicht Hefeenzym). In Rücksicht auf das von β-Methylglukosid etwas abweichende Verhalten und auf eine Verschiedenheit bezüglich des Laktonringes wäre eine eingehende Untersuchung der Einwirkung von Enzymen erwünscht.

Methyl-Sorboside.

Von E. Fischer wurde ein Methylsorbosid aus abs. methylalkoholischer Lösung durch 1% HCl dargestellt. $[\alpha]_D^{20} = -88{,}9°$. Der Sorbose kommt die untenstehende Konstitutionsformel zu, und zwar betrachtet Hudson die von Fischer gewonnene Verbindung als der l-Reihe zugehörig; sie ist als α-Methyl-l-Sorbosid zu bezeichnen. Die Verbindung wird weder von Hefeninfus noch von Emulsin gespalten.



Die von Lobry de Bruyn und A. van Ekenstein dargestellte Verbindung, $[\alpha]_D = +88{,}5°$, ist demgemäss als Methyl-d-Sorbosid anzusehen.

α-Methyl-Glukoheptosid.

Wird weder von Hefenenzymen noch von Emulsin angegriffen[3]).

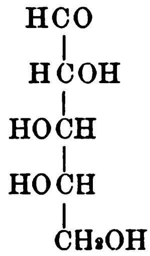
B. Pentoside und Methylpentoside.

l-Arabinoside.

Der (natürlich vorkommenden) l-Arabinose wird die untenstehende Konfigurationsformel zugeteilt. Von den nach der Fischerschen Methode daraus

[1]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1160; 1895.
[2]) Hudson und Brauns, Jl Amer. Chem. Soc. 38, 1216; 1916.
[3]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1156; 1895.

hergestellten Methyl-Arabinosiden wird die von Fischer isolierte α-Verbindung[1]) weder durch Hefenenzyme noch durch Emulsin gespalten.



Ebensowenig wird das entsprechende Aethyl- und Benzyl-Derivat von diesen Enzymen angegriffen.

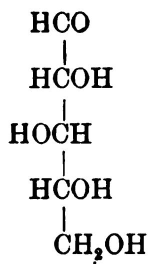
Purdie und Rose[2]) haben das β-Methyl-l-Arabinosid kristallisiert erhalten.

l-Xyloside.

Die Konfigurationsbezeichnung ist hier einigermassen willkürlich[3]).

β-Methyl-l-Xylosid[4]). Schmelzpunkt 155—156°. $[\alpha]_D^{20} = -65,9°$. Wird von Emulsin nicht gespalten (auch nicht von Hefenenzym) (Chem. Ber. 28, 1430).

α-Methyl-l-Xylosid[4]). Schmelzpunkt 90—92°. $[\alpha]_D^{20} = +153,2°$. Wird weder von Hefenenzymen noch von Emulsin gespalten.



Im allgemeinen scheinen Pentoside von Emulsin überhaupt nicht angegriffen zu werden[5]).

Gentiin.

Dieses von Tanret[6]) aus der Wurzel von Gentiana lutea gewonnene Glukosid — das einzige bekannte, welches Xylose enthält — wird durch verdünnte Säuren nach der Formel zerlegt:

$$\underset{\text{Gentiin}}{C_{25}H_{28}O_{14}} + 2\,H_2O = \underset{\text{Glukose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Xylose}}{C_5H_{10}O_5} + \underset{\text{Gentianin}}{C_{14}H_{10}O_5}.$$

Die enzymatischen Spaltungen sind noch nicht aufgeklärt.

---

1) E. Fischer, Chem. Ber. 27, 2985; 1894.

2) Purdie und Rose, Jl Chem. Soc. 89, 1204; 1906.

3) Siehe hierzu E. Fischer, Chem. Ber. 40, 103; 1907.

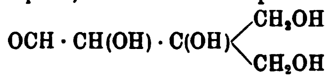
4) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1145; 1895.

5) Siehe auch Ryan und Ebrill, Proc. Irish Acad. 26, 5, 53; 1906. Ferner Levene u. Jacobs, Jl Biol. Chem. 11, 371; 1912.

6) Tanret, Bull. Soc. Chim. Paris (3) 33, 1073; 1905.

Apiin.

Das Petersilien-Glukosid Apiin [1]) enthält die Aldopentose **Apiose**



neben d-Glukose und Apigenin (1, 3, 3′ Trioxyflavon). Hydrolyse mit verdünnten Säuren liefert Glukoapigenin und Apiose. Apiose dürfte also an die Glukose zu einem Bioserest gebunden sein.

Apiin wird weder von Mandelemulsin noch von Aspergillusextrakt zerlegt. Vermutlich sind zur vollständigen Spaltung 2 Enzyme, eine **Apiinase** und eine Glukoapigeninase, erforderlich; ihre Existenz ist noch nicht erwiesen.

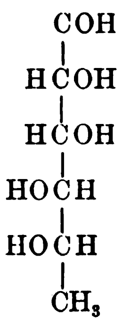
Riboside.

Hierher sind die Riboside der Purin- und Pyrmidinbasen zu zählen, welche ihr Entdecker Levene [2]) als Nukleoside zusammenfasst, und wenn man die Systematik der Substrate ausschliesslich massgebend sein liesse, so wären die Enzyme der Nukleoside in diesem Abschnitt zu behandeln. Da indessen die Wirksamkeit und Rolle dieser **Nukleosidasen** in engerem Zusammenhang mit den übrigen Enzymen der Nukleoproteide und Nukleinsäuren steht, so sollen sie auch mit diesen in der zweiten Hälfte dieses Buches beschrieben werden.

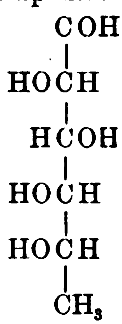
Rhamnoside.

Die natürlich vorkommende Rhamnose (siehe untenstehende Formel), $[\alpha]_D^{20} = +8{,}9^0$ nach Hudson [3]), wird als l-Rhamnose angesehen [4]). Aus der natürlichen Rhamnose hat E. Fischer [5]) ein Methylrhamnosid dargestellt, welches weder durch Emulsin noch durch Hefenenzym spaltbar ist [6]).

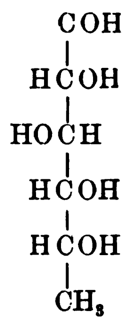
Ebenfalls durch Emulsin unangreifbar dürfte die entsprechende Methylverbindung der l-Isorhamnose = l-Epi-Rhamnose [7]) sein.



l-Rhamnose (Isodulcit)



l-Epi-Rhamnose (l-Iso-Rhamnose)



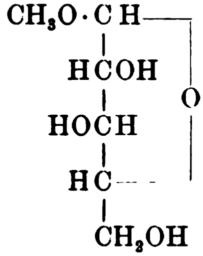
d-Epi-Rhamnose (Iso-Rhodeose)

---

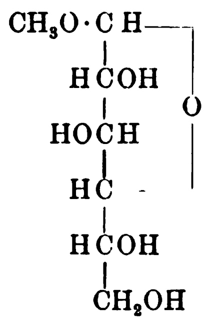
[1]) Vongerichten, Lieb. Ann. 318, 121; 1901 und 321, 71; 1902.
[2]) Levene und Medigreceanu, Jl Biol. Chem. 9, 65; 1911.
[3]) Hudson, Jl Amer. Chem. Soc. 39, 1013; 1917.
[4]) Votoček, Chem. Ber. 44, 821 und 824; 1911.
[5]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1158; 1895.
[6]) E. Fischer, Chem. Ber. 27, 2985; 1894 und H. 26, 60; 1898.
[7]) E. Fischer und Herborn, Chem. Ber. 29, 1961; 1896.

Dagegen hat Fischer gezeigt, dass das β-Methyl-Derivat ihrer optischen Antipode, die d-Epi-Rhamnose durch Emulsin leicht spaltbar ist[1]). „Für den Angriff des Enzyms ist also die endständige Alkoholgruppe des Traubenzuckers nicht nötig. Um so beachtenswerter erscheint nun das Verhalten der beiden Methylxyloside, welche aus Xylose durch alkoholische Salzsäure unter denselben Bedingungen gebildet werden wie α- und β-Methylglukosid am Traubenzucker." Aus der Ähnlichkeit der Bildungsweise und der Konfiguration der Xylose hat Fischer geschlossen, dass das d-Iso-Rhamnosid (d-Epi-Rhamnosid) in der Mitte zwischen den Xylosiden und den Methyl-d-Glukosiden steht. (Vgl. hierzu I. Teil, S. 247.)

Es erscheint lohnend, eine eingehende Untersuchung darüber anzustellen, ob tatsächlich allgemein die β-Methylglukoside der Zucker der d-Reihe von Mandelemulsin gespalten werden, während die Zucker der l-Reihe unangegriffen bleiben. Man könnte bis jetzt auf Grund der vorliegenden Angaben versucht sein, die obigen von Fischer hervorgehobenen Tatsachen darauf zurückzuführen, dass beide Xyloside der l-Reihe angehören, im Gegensatz zum d-Epi-Rhamnosid und dass ein Konfigurationsunterschied zwischen dem β-Methylxylosid und dem β-Methylglukosid besteht, welcher durch die nachstehenden Formeln nicht zum Ausdruck kommt:



Xylosid.



Glukosid.

Natürliche Rhamnoside. Rhamnose ist in zahlreichen natürlichen Glukosiden enthalten; und zwar teils als einzige Zuckerart (Quercitrin, Frangulin u. a.), teils zusammen mit Glukose (Hesperidin, Rutin u. a.), teils zusammen mit Galaktose (Xanthorhamnin). Die meisten natürlichen Rhamnoside sind Xanthon- und Flavonderivate. Ob dabei eigentliche Flavonrhamnoside vorliegen, oder ob die Rhamnose an die Hexose gebunden ist, steht in vielen Fällen noch nicht fest.

Mandelemulsin scheint gegenüber Rhamnosiden unwirksam zu sein, was bei den echten Flavon-Rhamnosiden und auch bezüglich der Spaltung zwischen Glukose und Rhamnose auf die Zugehörigkeit der Rhamnose zur l-Reihe zurückgeführt werden kann.

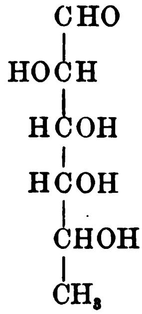
---

[1]) E. Fischer und Zach, Chem. Ber. 45, 3761; 1912.

Schliesslich ist unter den Rhamnosiden auch das Trisaccharid **Rhamninose**, bestehend aus Glukose-Rhamnose-Rhamnose zu erwähnen. Auch hier ist über spezifische Enzyme nichts Genaues bekannt.

Fucoside.

Die Fucose, deren d-Form (die frühere Fucose) die untenstehende Konfiguration besitzt, kommt neben Arabinose bzw. Xylose in Tragantgummi vor, welcher zu seiner Spaltung ein besonderes Enzym (evtl. zwei solche) erfordert.



d-Fucose.

Die Rhodeose ist nach Votočck[1]) das Spiegelbild, also l-Fucose. Letztere ist in einigen natürlichen Glukosiden (Jalapin) gefunden worden. Über das entsprechende Enzym ist nichts bekannt.

C. Alkyl- und Phenyl-Bioside.

β-Maltoside.

Aus dem von Fischer und E. F. Armstrong[2]) dargestellten β-Methylmaltosid wird durch Emulsin Maltose freigemacht. Dagegen spaltet Hefenextrakt in Traubenzucker und β-Methylglukosid.

Ähnlich verhält sich β-Phenyl-Maltosid[3]), welches durch Emulsin ebenfalls in Maltose und Phenol verwandelt wird, und das gleiche gilt von einem Menthol-Maltosid.

---

[1]) Votočck, Chem. Ber. 43, 469; 1910.
[2]) E. Fischer und E. F. Armstrong, Chem. Ber. 34, 2896; 1901.
[3]) E. Fischer und Armstrong, Chem. Ber. 35, 3144; 1902.

Kapitel 10.

β-Galaktosidasen.

A. Alkyl-β-Galaktosidasen.

Sowohl α- als β-Methylgalaktosid ist von E. Fischer[1]) dargestellt worden.

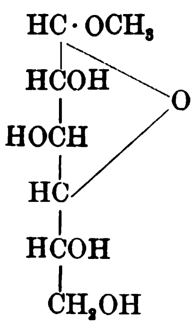
α-Methylgalaktosid, Schmelzpunkt 110°. $[\alpha]_D^{20} = +179{,}3°$ (p = 9). Weder Enzyme tierischen Ursprungs[2]) noch Hefenenzyme noch Kefirenzyme[3]) spalten. Pottevin[4]) hat eine Einwirkung durch ein Enzym aus Aspergillus niger beobachtet und nach Bierry (C. r. 149) enthält Helix pomatia sowohl eine α- als eine β-Galaktosidase.

β-Methylgalaktosid[1])[5]), Schmelzpunkt 173—176°. Wässerige Lösung zeigt keine deutliche Drehung; in kalt ges. Boraxlösung (p = 8,5) $[\alpha]_D^{20} = +2{,}6°$.

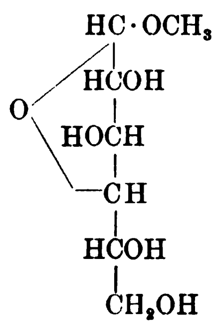
Für die Geschwindigkeit der Säurespaltung geben Armstrong und Caldwell folgende relative Zahlen an[6]):

α-Methylglukosid .	100
β-Methylglukosid .	179
α-Methylgalaktosid	542
β-Methylgalaktosid	884
Laktose	582.

Zur Beurteilung der Stellung der β-Methylgalaktosidase zur β-Methyl-Glukosidase seien hier die Formeln der beiden Substrate nebeneinandergestellt:



β-Methyl-Glukosid.



β-Methyl-Galaktosid.

[1]) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1154; 1895. — Fischer und Beensch, Chem. Ber. 27, 2480; 1894.

[2]) E. Fischer und Niebel, Sitz.-Ber. Preuss. Akad. 5, 73; 1896.

[3]) E. Fischer, Chem. Ber. 27, 2985 und 3482; 1894.

[4]) Pottevin, Ann. Inst. Pasteur 17. 31; 1903.

[5]) Königs und Knorr, Chem. Ber. 34, 979; 1901.

[6]) Siehe auch E. F. Armstrong, The simple Carbohydrates, 3. Aufl. S. 130.

Die beiden Stoffe unterscheiden sich also nur durch die räumliche Lage des Laktonringes.

Die Spaltung durch (Mandel-)Emulsin hat E. Fischer 1895 gefunden[1]).

„Der Versuch ist interessant genug, um ausführlich mitgeteilt zu werden. 1 Teil des Galaktosids wurde in 10 Teilen Wasser gelöst, mit 0,2 Teilen Emulsin versetzt und während 3 Tagen auf 33° erwärmt. Es waren dann 35% des Materials in Zucker verwandelt. Bei Anwendung der doppelten Menge Emulsin stieg die Spaltung auf 60%."

Wird ausserdem durch Kefirlaktase[2]) und durch ein Enzym aus Aspergillus niger gespalten, ferner wie oben erwähnt, durch ein Helix-Enzym[3]). Bierry hat übrigens an Helix-Material Beobachtungen gemacht, welche auf eine Verschiedenheit von β-Alkylgalaktosidasen und Laktase hindeuten können. Die Äthylgalaktoside verhalten sich analog mit den Methylverbindungen.

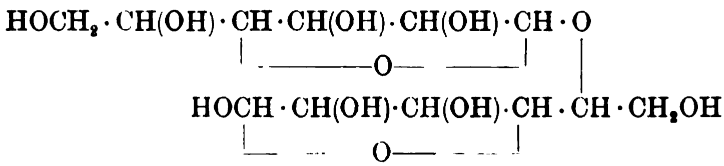
Das Gleichgewicht, welches unter Einwirkung von Emulsin zwischen Galaktose und Propylalkohol eintritt hat Bridel[4]) nach dem Massenwirkungsgesetz berechnet.

B. Laktase.

Substrat: Milchzucker; α-Modifikation (gewöhnlicher Milchzucker) $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$. Das Kristallwasser entweicht erst bei 125°. $[\alpha]_D^{20} = +90°$. Die Mutarotation ist eingehend von Hudson studiert[5]). α-Laktose ist = α-Glukose-β-Galaktosid.

β-Modifikation; $C_{12}H_{22}O_{11}$; Umwandlungstemperatur in α-Modifikation 92—93°. $[\alpha]_D^{20} = +35°$. β-Laktose ist β-Glukose-β-Galaktosid. $[\alpha]_D^{20}$ im Gleichgewicht wasserhaltig = + 52,5° nach v. Lippmann[6]).

Nach Haworth und Leitch[7]) ist die Bindung zwischen der Glukose und der Galaktose folgende:



Ferner ist zu erwähnen, dass es E. Fischer und Curme[8]) gelungen ist, das Hydrolaktal $C_{22}H_{22}O_9$ mittels Emulsin zu spalten. Der Nachweis der Spaltprodukte, Galaktose (als Schleimsäure) und Hydroglucal wurde in einwandfreier Weise geliefert.

Eine von Fischer und Armstrong (Chem. Ber. 35) vermittels Kefirkörnern synthetisch dargestellte Isolaktose ist noch nicht rein dargestellt.

1) E. Fischer, Chem. Ber. 28, 1429; 1895.
2) E. Fischer und E. F. Armstrong, Chem. Ber. 35, 3155; 1902.
3) Bierry und Giaja, Soc. Biol. 61. 485; 1906.
4) Bridel, C. r. 172, 1288; 1921.
5) Hudson, Zs physik. Chem. 44, 487; 1903. — Jl Amer. Chem. Soc. 26, 1065; 1904.
6) v. Lippmann, Chemie der Zuckerarten, 3. Aufl., S. 1528.
7) Haworth und Leitch, Jl Chem. Soc. 113, 188; 1919.
8) E. Fischer und Curme, Chem. Ber. 47, 2047; 1914.

Durch den verdauenden Saft von Helix pomatia wird nach Bierry und Giaja[1]) auch die Laktobionsäure angegriffen; es entsteht Galaktose und Glukonsäure; der mazerierte Darm eines Kuh- oder Schafffötus zeigte diese Wirkung nicht oder nur in geringen Grad. Durch Helix-Saft soll sich auch das Laktosazon in Galaktose und Glukosazon zerlegen lassen[2]).

1. Tierische Laktasen.

Vorkommen: Im Darm junger Säugetiere[3]); der Einfluss des zugeführten Zuckers ist noch nicht endgültig festgestellt (siehe z. B. Strauss, Berl. Klin. Wochenschr. 1898). Demgemäss auch im Kot von Säuglingen (Langstein und Steinitz, 1906) und säugender Tiere (Porcher, 1900). Laktase tritt nach Porcher[4]) bei Katzen, Hunden, Kälbern (hier am 45. Tage) in der Darmschleimhaut schon während des fötalen Lebens auf, und nimmt mit dem Alter des Fötus zu. Bei älteren Tieren nimmt der Laktasegehalt im Darm ab oder verschwindet ganz, soll aber durch längere Milchfütterung wieder hervorgerufen werden können[5]). Im menschlichen Darmsaft haben Hamburger und Hekma[6]) keine Laktase gefunden.

Brustdrüsen von säugender Katze, Ziege, Kuh zeigten keine Laktosespaltung. Auch ist es zweifelhaft, ob Milch Laktase enthält[7]).

Pankreas soll weder beim Säugling[8]) noch beim ausgewachsenen Menschen[9]) und nach E. Fischers und Niebels Befund auch nicht bei Pferd und Rind Laktase enthalten; wogegen Weinland[10]) im Hundepankreas Laktase fand, die bei Milchfütterung zunahm. Gegenteilige Angaben von Bierry[11]) und Plimmer[12]).

In anderen Organen höherer Tiere ist Laktase nicht angetroffen worden.

Der Verdauungstraktus von Helix pomatia spaltet Milchzucker[13]); ungewiss ist, ob dieses Enzym mit der Laktase höherer Tiere identisch ist.

Andererseits bestehen vielleicht zwischen diesen und pflanzlichen Laktasen ähnliche Unterschiede wie zwischen den Saccharasen.

---

[1]) Bierry und Giaja, C. r. 147, 268; 1908.

[2]) Bierry C. r. 148, 949; 1909.

[3]) Röhmann und Lappe, Chem. Ber. 28, 2506; 1895. — Portier, Soc. Biol. 50, 387; 1898. — Bierry und Salazar, Soc. Biol. 57, 181; 1904.

[4]) Porcher, Soc. Biol. 83, 420; 1920.

[5]) Foà, Arch. di Fisiol. 8, 121; 1910.

[6]) Hamburger und Hekma, Jl de Physiol. Pathol. gén. 4, 805; 1902.

[7]) Vandevelde, Biochem. Zs 11, 61; 1908. — Bradley, Jl Biol. Chem. 13, 431; 1913. — M. Hahn, Münch. med. Wochenschr. 1911.

[8]) Ibrahim, H. 62, 287; 1909.

[9]) Glaessner, H. 40, 465; 1903.

[10]) Weinland, Zs Biol. 38, 607; 1899.

[11]) Bierry, Soc. Biol. 58, 701; 1901.

[12]) Plimmer, Jl of Physiol. 35, 20; 1906.

[13]) Bierry und Giaja, Soc. Biol. 60, 1038; 1906.

Über die Wirkungsbedingungen der tierischen Laktasen ist nichts Näheres bekannt.

Eine Antilaktase wurde durch subkutane Injektion von Kefirlaktase gesucht (vgl. I. Tl., S. 277).

Zerlegung von Milchzucker im Blut nach subkutaner Injektion.

Abderhalden[1]) hat im Anschluss an seine Arbeiten über „Abwehrfermente" mit Brahm diesbezügliche Versuche angestellt, und schliesst daraus, dass nach subkutaner Injektion des „blutfremden" Milchzuckers „das Plasma resp. Serum Eigenschaften annimmt, die vor den Injektionen nicht nachweisbar sind. Alles deutet darauf hin, dass Fermente auftreten, die die genannten Zuckerarten in ihre Komponenten zerlegen".

Bestätigungen dieses Ergebnisses wären offenbar von grossem Interesse.

2. Laktosespaltung durch Mandelemulsin.

Die Milchzuckerspaltung durch Mandelemulsin ist besonders von H. E. und E. F. Armstrong[2]) und ihren Mitarbeitern und neuerdings von Willstätter und Csányi[3]) untersucht worden.

Das hierbei wirksame Enzym nennen wir im folgenden, dem Vorschlag von Bourquelot und Hérissey[4]) folgend, Laktase; es muss dabei aber ausdrücklich betont werden, dass eine sichere Abgrenzung noch nicht gegen alle anderen Emulsinbestandteile durchgeführt ist[5]), und dass andererseits dieses Mandelenzym mit der Kefirlaktase vielleicht nicht[2]), und mit den tierischen Laktasen wahrscheinlich nicht identisch ist.

Willstätters Tabelle über den Einfluss von Mandelpräparaten auf Laktose und andere Substrate ist bereits Seite 241 mitgeteilt.

Vorkommen: Es sei hier auf den Abschnitt „Emulsin", S. 210 u. ff., verwiesen und auf die dort angegebenen Reinigungsmethoden.

Wirkungsbedingungen: Die optimale Azidität lässt sich aus den von Willstätter mitgeteilten Kurven, Fig. 34 S. 243, entnehmen, sie liegt im pH-Gebiet 4,2—4,6; bei pH = 3 ist die Wirkung noch bedeutend; das zeigt auch folgender Auszug aus einer von Willstätter angebenen Tabelle:

pH	3,2	3,8	4,4	4,9	6,0	7,0	8,0
Rel. Wirksamkeit .	62	85	100	91	62	14,5	4,5.

Einfluss von Alkohol. Bemerkenswert ist die von Bridel[6]) festgestellte Tatsache, dass Mandellaktase noch in 85 %igem Äthylalkohol zu spalten vermag.

---

1) Abderhalden und Brahm, H. 64, 329; 1910.

2) H. E. und E. F. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 80, 321; 1908.

3) Willstätter und Csányi, H. 117, 172; 1921.

4) Bourquelot und Hérissey, Soc. Biol. 55, 219; 1903.

5) Willstätter (l. c.) hat gezeigt, dass das Verhältnis der Laktase zu Prunase im Emulsin veränderlich ist, nämlich 577 bei Aprikosenkernen, 3740 in einem Mandelpräparat.

6) Bridel, C. r. 173, 501; 1921. — Bezgl. Methylalkohol, Jl Pharm. Chim. (7) 22.

Kinetik.

Die Messungen von Armstrong sind offenbar durch die Inkonstanz der Azidität (Mangel an Puffer) mehr oder weniger beeinflusst. Wir führen trotzdem einige Zahlen aus seinen Untersuchungen über Mandelemulsin an[1]). Neben den Versuchszeiten sind die gespaltenen Mengen Milchzucker in Prozenten und in der 3. Kolumne die nach der Formel für monomolekulare Reaktionen berechneten Reaktionskoeffizienten angegeben. Die 4. Kolumne ist vom Verf. berechnet.

2 g Milchzucker, 0,2 g Emulsin in 100 ccm

Min.	x	$k \cdot 10^4$	$\frac{x}{\sqrt{t}}$
0,5	3,2	282	4,5
1	4,8	214	4,8
2	6,4	148	4,5
3	7,6	114	4,4
4,5	9,0	91	4,2
6	10,0	91	4,1
23	19,7	41	4,1
29	22,0	37	4,1
48	29,0	31	4,2
53	30,7	30	4,2
144	62,2	29	5,2
264	77,5	24	4,9

2 g Milchzucker, 0,4 g Emulsin in 100 ccm

Min.	x	$k \cdot 10^4$	$\frac{x}{\sqrt{t}}$
1	4,9	218	4,9
2	7,5	169	5,3
4,5	9,4	95	4,4
6	10,6	81	4,3
23	30,5	69	2,0
29	35,5	64	2,0
48	47,8	59	2,2
53	50,0	57	2,2
144	84,0	55	7,0

Eine einfache Beziehung zwischen Reaktionszeit und umgesetzter Menge ist aus diesen Zahlen nicht ohne weiteres ersichtlich; ebensowenig geht aus den in der erwähnten Arbeit gegebenen Tabellen eine einfache Beziehung zwischen der Geschwindigkeit der Reaktion und der Enzymkonzentration hervor.

Spätere Versuche (Proc. Roy. Soc. 80, 326; 1908) geben einen engeren Anschluss an den Verlauf monomolarer Reaktionen, wenn mit relativ viel Enzym (Mandelextrakt) gearbeitet wurde.

5%ige Milchzuckerlösung.

	40 ccm Enzymlösung		60 ccm Enzymlösung	
Stunden	x	$k \cdot 10^4$	x	$k \cdot 10^4$
2	15,2	358	18,5	444
3	18,5	296	22,7	373
5	21,1	251	36,5	394
7	33,5	253	44,9	380
9	42,2	264	52,5	360
10	44,0	252	53,5	332
24	73,4	240	76,0	258

Wie die dritte und fünfte Spalte ergibt, wurde auch bei diesen Versuchen keineswegs durchgehende Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Geschwindigkeit gefunden; nur relativ kleine Enzymmengen hydrolysierten ihrer Konzentration proportional.

---

[1]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B. 73, 500, 516, 526; 1904.

Die folgende Tabelle ist der Untersuchung von Willstätter und Csányi entnommen:

0,7%ige Lösung, 500 mg Emulsin; pH = 4,4. 30°.

Stunden	x	$k \cdot 10^4$
4	15	410
7	24	390
21	55	380
24	61	390
30	69,5	396
46	85	410

Hier zeigt sich also eine recht befriedigende Konstanz der k-Werte.

Armstrong gab folgende Tabelle über den Einfluss der Laktase-Konzentration auf die Spaltungsgeschwindigkeit einer 5%igen Milchzuckerlösung; sie zeigt die gespaltenen Zuckermengen in Prozenten (l. c. 73, 510).

ccm Laktase	1,5 Stunden	20 Stunden	25 Stunden	45 Stunden	68 Stunden
1,0	0,15	2,2	2,6	3,9	4,8
2,5	0,4	5,8	6,8	10,2	12,6
10	1,6	23,3	—	38,6	48,5
20	3,2	45,8	54,5	—	—

Die pro Zeiteinheit hydrolysierten Quantitäten werden also den Enzymkonzentrationen, solange diese nicht sehr gross sind, angenähert proportional gefunden. Dies zeigen auch die folgenden Zahlen (Proc. 80, 326).

Enzymmenge:	10	20	40	60 ccm
Geschwindigkeits-Konstante $k \cdot 10^4$:	107	212	279	385

Dann hört ihre Wirksamkeit auf, was so gedeutet wurde, dass die Spaltprodukte Glukose und Galaktose das Enzym binden und es dadurch der Reaktion mit dem Substrat entziehen.

Über den Einfluss der Spaltprodukte haben H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton (Proc. 80) weitere Versuchsreihen angestellt, von welchen hier eine (l. c. 328) mitgeteilt sei:

5 g Milchzucker in 100 ccm. 40 ccm Extrakt aus bitteren Mandeln + 5 g Glukose oder Galaktose.

Stunden	g Milchzucker gespalten		
	ohne Zusatz	Glukose	Galaktose
2	0,35	0,05	0,36
5	0,85	0,10	0,88
10	1,225	0,37	1,23
24	2,025	0,75	1,96

Hier übt also Glukose eine stark hemmende Wirkung aus, was bei der Kefirlaktase nicht der Fall ist.

Variiert man die Milchzuckermenge, so findet man, wenn relativ viel Enzym zugegen ist, Proportionalität zwischen der Zuckerkonzentration und der in der Zeiteinheit gespaltenen Menge, also gleiche Werte für die Reaktionskoeffizienten k.

Gespaltene Milchzuckermengen in Prozenten:

Milchzucker in 100 ccm	Gespalten nach 3 Stunden	$k \cdot 10^4$
1,0 g	0,185	296
0,5 g	0,098	298
0,2 g	0,0416	337

Für relativ grosse Substratmengen wird die prozentische Menge gespaltenen Zuckers umgekehrt proportional der Zuckerkonzentration, so dass also in der Zeiteinheit gleiche absolute Mengen Zucker gespalten werden, welches auch seine Konzentration ist.

Einfluss der Temperatur.

H. E. Armstrong, E. F. Armstrong und Horton (l. c. 80, 325) beschreiben bemerkenswerte Temperatureinflüsse auf das Emulsin.

Eine von ihnen aus Mandeln hergestellte Emulsinlösung war bei 15° gegen β-Methylglukosid ziemlich wirksam, während Milchzucker nur wenig angegriffen wurde; dagegen wurden bei 36° beide Substrate verhältnismässig rasch hydrolisiert. Dies liesse auf einen hohen Temperaturkoeffizienten der enzymatischen Milchzuckerspaltung durch die Mandel-Laktase schliessen.

Wurde der Extrakt ca. 3 Stunden auf 45° erwärmt, so verlor er dadurch vollständig seine Wirkung gegen Milchzucker, dagegen behielt er seine Aktivität gegen β-Methylglukosid, Amygdalin und Salicin nicht allein nach 20 stündiger Erhitzung auf 45°, sondern nach mehrstündiger Erhitzung auf 55° in Gegenwart dieser Substrate; erst Erhitzen auf 59° zerstörte. (In Betracht zu ziehen ist, dass sich die Laktase in einer für ihre Stabilität ungünstigen Azidität befunden haben kann.)

Ferner beschreiben die englischen Autoren einen qualitativen Versuch, bei welchem sie Mandeln bei 0° und darauf bei 45° mit Wasser extrahieren. Aus der Wirksamkeit der beiden Extrakte bei 38° und bei 15° glauben sie den Schluss ziehen zu können, dass die Laktase vorzugsweise bei der niedrigen Temperatur extrahiert wurde. Quantitative Messungen wären wünschenswert.

3. Laktase in Pilzen und Bakterien.

Vorkommen. In Milchzuckerhefen (Saccharomyces Kefir und Sacch. Tyrocola) von Beijerinck[1]) und von E. Fischer[2]) nachgewiesen. Aus armenischer Mazunhefe gewannen Buchner und Meisenheimer[3]) einen Presssaft, welcher Milchzucker spaltete. Über wirksame Saccharomyceten siehe S. 290. Im allgemeinen wird die Fähigkeit Milchzucker zu spalten den Torulaceen

[1]) Beijerinck, Zbt Bakt. 6, 44; 1889.

[2]) E. Fischer, Chem. Ber. 27, 2985 und 3479; 1894.

[3]) Buchner und Meisenheimer, H. 40, 167; 1903.

zugeschrieben [1]), wie denn auch die von Duclaux und Adametz beschriebenen Milchzuckerhefen als Torulaarten aufgefasst werden. Indessen muss hierzu bemerkt werden, dass der Nachweis von „Laktase" vielfach dadurch geführt worden ist, dass die Fähigkeit der betreffenden Mikroorganismen, Milchzucker zu vergären, gezeigt wurde. Nachdem neuerdings Willstätter [2]) die Auffassung ausgesprochen hat, dass auch eine direkte Vergärung des Milchzuckers (ohne vorhergehende Hydrolyse) eintreten kann und oft eintritt, ist also — wie man sich auch zu dieser Annahme stellt — jedenfalls genau darauf zu achten, in welcher Weise der Nachweis einer Laktase in den einzelnen Fällen geführt worden ist.

Schliesst man sich übrigens der Auffassung von Willstätter an, so muss man die bisherige Darstellung vom Zusammenwirken der Streptokokken a und b (v. Freudenreich) mit der Kefirhefe und die Auffassung der Rolle der Milchsäurebakterien etwas modifizieren.

Auch anderen Streptobazillen wird die Fähigkeit der Laktosespaltung zugeschrieben.

Ausser in Torulaceen ist Milchzuckerspaltung noch in Aspergillaceen und in Mucorarten nachgewiesen worden.

Wegen der zahlreichen weiteren Angaben über Milchzuckerspaltung verweisen wir auf das Handbuch von Lafar [3]), ausserdem auf eine bemerkenswerte Arbeit von H. Pringsheim und Zemplén [4]).

Indessen ist hier eine Angabe von Pottevin zu prüfen, dass Aspergillus niger nur eine β-Glukosidase, keine β-Galaktosidase und keine Laktase enthält (vgl. S. 214).

Über den Laktasegehalt einiger Milchzuckerhefen gibt folgender Auszug aus einer Tabelle von Willstätter und G. Oppenheimer Auskunft.

Hefe	Nährlösung	Laktase-Zeitwert
S. fragilis	Hefedekokt; 3 Proben	17—60
„	Bierwürze	2880; 2700
„	„	300—1560 [5])
Berlin Sp. 60 a	anorganische Nährlösung + Pepton	11—7
„ „	kalter Malzauszug	35—25
„ „ 102	anorganische Nährlösung + Malzauszug	60

Darstellung. Als Ausgangsmaterial wurden von Fischer, Armstrong, Barendrecht Kefirkörner verwendet. Man findet Angaben über

[1]) Siehe hierzu Will und Scheckenbach, Zbt Bakt. II, 35, 1; 1912.

[2]) Willstätter und Oppenheimer, H. 118, 168; 1922.

[3]) Lafar, Handbuch d. techn. Mykologie, 2. Aufl., 1904—1907; siehe besonders Bd. I und IV. Siehe ferner Heintze und Cohn, Zs Hygiene 46, 286; 1904.

[4]) H. Pringsheim und Zemplén, H. 62, 367; 1909.

[5]) Kleine Versuchszeiten scheinen hier kleine Zeitwerte zu ergeben.

die Bereitung von Kefirlaktase[1]) bei Fischer und Zemplén[2]) und Armstrong[3]). Kefirkörner des Handels sind nach Erfahrungen von Willstätter, die Verf. bestätigen kann, oft sehr wenig wirksam.

Willstätter und G. Oppenheimer haben Reinkulturen angewandt:

1. Von Sacch. fragilis Jörgensen[4]). (Weitergezüchtet mit Hefedekokt unter Zusatz von 7—10% Laktose bei 26°: Ausbeute in 3 Kolben von je 3 l zusammen 8—20 g. Bei Anwendung von Bierwürze schien die Hefe ärmer an Laktase zu sein.)

2. Von 2 Milchzuckerhefen Sp. 60 a und Sp. 102 aus dem Berliner Institut für Gärungsgewerbe. (In anorganischer Nährlösung + Pepton oder in kalt bereitetem Malzauszug oder in einer Mischung beider + 10% Milchzucker betrug die Ausbeute in 2 Wochen 2,5—3 g.)

Laktase lässt sich in der frischen Hefe nicht direkt, etwa wie Saccharase in Bierhefe, bestimmen. Die Methode der Maltasebestimmung in Hefe von Willstätter und Steibelt[5]) (siehe S. 157 und 158) liess sich auch auf Laktase übertragen.

„Wird die Hefe mit dem abtötenden Mittel sorgfältig verrieben, so tritt im allgemeinen keine Gärung mehr ein, aber Ausnahmen kommen vor, sogar nach zweitägiger Einwirkung von Chloroform oder Toluol." „Bei der Laktase fällt durch die Gärung der Zeitwert zu niedrig aus. Es wäre am besten, die Analyse so zu vervollkommnen, dass nach der Zeitwertbestimmung die Hydrolyse bis zum Ende weitergeführt würde, wobei ein Zuckerverlust durch Gärung nicht unbemerkt bliebe."

Bestimmung der Laktase siehe S. 297 u. ff.

Während bei der Saccharasedarstellung die Enzymausbeute im Extrakt + Heferückstand gewöhnlich gleich dem des Ausgangsmaterials ist, erhielten Willstätter und Oppenheimer bei der Bestimmung der Laktase in den Hefeauszügen + Rückständen Verluste.

„Um ohne Trocknung aus der Hefe Laktase zu isolieren, wurde die Hefe (5 g S. fragilis vom Zeitwert 300) in frischem Zustand durch Verreiben während etwa 10 Minuten mit 1 ccm Chloroform verflüssigt, dann mit 7 ccm Wasser verdünnt und vorsichtig mit 1,1 ccm 1%igem Ammoniak neutralisiert. Im Laufe von 6 Stunden war die Flüssigkeit wieder merklich sauer, sie verbrauchte noch 0,3 ccm Ammoniak. — Nach etwa 3 Tagen wird die Laktaselösung abfiltriert; Ausbeute beispielsweise 77% (nach 3 Tagen)."

„Es ist mühsamer und nicht ergiebiger, die enzymatische Freilegung zu ersetzen durch weitgehende Zerstörung der Zellstruktur des Pilzes."

Beispiel der Darstellung von Laktase aus luftgetrockneter Hefe ohne Zerkleinerung und ohne Toluolzusatz: l. c. S. 181.

Wirksamkeitsbedingungen. Als optimale Aziditätszahl der Hefenlaktase nimmt Willstätter mit Vorbehalt 7 an. Diese Azidität wird mit 10 ccm Phosphatpuffer nach Sörensen im Verhältnis 3,8 prim.: 6,2 sek. Salz eingestellt; grosse Puffermenge zweckmässig.

---

[1]) Über Züchtung der Kefirhefe siehe auch Barendrecht, Zs physik. Chem. 54, 367; 1906.
[2]) E. Fischer und Zemplén, Lieb. Ann. 372, 254; 1910.
[3]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. B 73, 500; 1904.
[4]) A. Jörgensen, Die Mikroorganismen in der Gärindustrie, 5. Aufl., Berlin 1909, S. 377.
[5]) Willstätter und Steibelt, H. 111, 157; 1920.

Sehr widerstandsfähig ist nach einer Beobachtung von Bridel[1]) die Laktase gegen Methylalkohol. In Lösung von 70% Methylalkohol behielt ein Emulsinpräparat seine Aktivität gegen Milchzucker und gegen Äthylgalaktosid während 5 Jahren.

Paralysatoren. Toluol, Chloroform und Essigester scheinen die Wirkung der von Willstätter und Oppenheimer dargestellten Laktase nicht zu hemmen. Die von diesen Autoren beobachteten Verschiedenheiten in der Geschwindigkeit der Laktosespaltung bei Anwendung verschiedener abtötender Mittel wird von ihnen auf eine ungenügende Unterdrückung der Gärwirkung zurückgeführt.

Kinetik.

Die ersten Versuche hat Armstrong (l. c.) mit Kefirenzym 1904 ausgeführt, mit der nicht ganz befriedigenden Versuchsanordnung der damaligen Zeit.

2 g Milchzucker per 100 ccm.

I: 100 ccm Enzym-Extrakt			II: 40 ccm Enzym-Extrakt		
Stunden	x	$k \cdot 10^4$	Stunden	x	$k \cdot 10^4$
1	22,1	1085	0,33	3,2	423
2	31,2	812	0,66	6,4	430
3	38,9	713	1	9,6	438
4	45,8	665	1,5	13,2	410
5	51,5	629	2	16,4	389
6	56,6	664	3	20,8	338
10	69,0	509	5	25,2	252
17	84,2	471	28	47,6	122
23	92,4	461	100	89,6	82

Barendrecht[2]) fand mit ziemlich wirksamem Kefirextrakt in 8%iger Milchzuckerlösung bei 30° eine starke Abnahme von k mit der Zeit.

Auch Willstätter und Oppenheimer stellen bei ihren mit moderner Methodik ausgeführten Messungen eine deutliche Abnahme der Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung fest.

5% Laktose. — Laktase aus 0,8 g S. fragilis. — 30°. — pH = 7.

Minuten	mg Cu	% Spaltung	$k \cdot 10^4$
0	62,4	—	—
30	69,4	28	48
52	71,9	37	39
60	72,6	40	37
70	73,9	43	35
80	75,2	47	34,5
90	75,8	49	32,5
110	77,1	55	31,5
135	78,8	62	31
172	80,3	65	26,5
210	81,8	69	24
270	83,3	73,5	21
390	85,8	84	20
550	87,3	87,5	18

[1]) Bridel, Jl de Pharm. et de Chim (7) 22, 323; 1920.

[2]) Barendrecht, Zs physik. Chem. 54, 369; 1906. Auf die Strahlungshypothese dieses Forschers ist schon im I. Teil, S. 242 hingewiesen worden.

Was die Proportionalität von Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge betrifft, so fanden die gleichen Autoren „bei Versuchen mit wenig Laktase und sehr langer Dauer zu geringen Umsatz, offenbar deshalb, weil das empfindliche Enzym verdarb". Indessen fanden sie im engen Bereich (1 : 2) genau bestätigt, dass die Zeiten gleichen Umsatzes sich umgekehrt wie die Enzymmengen verhalten.

5 ccm Enzymlösung	in 4 Stunden	14 %	Spaltung
10 ccm „	„ 2 „	14 %	„ .

Bemerkenswert ist der verschiedene Einfluss, welchen die Spaltprodukte Glukose und Galaktose auf die Wirkung der Kefirlaktase und des Emulsins ausüben. Es sei diesbezüglich auf die Untersuchung von E. F. Armstrong[1]) verwiesen, aus dessen Tabelle folgender Auszug stammt:

Enzym	Substrat	Wirkung d. Glukose	Wirkung d. Galaktose	Wirk. d. Fruktose
Kefir-Laktase	Milchzucker Alkyl-β-Galaktoside	keine Wirkung	Verzögerung	keine W.
Emulsin	β-Glukoside	starke Verzögerung	geringe Verzögerung	keine W

Über den Einfluss der Temperatur auf die Stabilität der Hefenlaktase und über den Temperaturkoeffizienten der Hydrolyse liegen noch keine Messungen vor.

Laktase in der lebenden Hefe.

Wie schon erwähnt, hat Willstätter die Auffassung geäussert und durch sehr wichtige quantitative Versuche gestützt, dass in Milchzuckerhefen eine direkte Vergärung der Laktose ohne vorhergehende Spaltung eintreten kann. Da es sich gegenwärtig kaum entscheiden lässt, ob dies die einzig mögliche bzw. die einfachste Deutung seiner experimentellen Ergebnisse ist, mag eine Diskussion dieser interessanten und schwierigen Frage hier unterbleiben; bei der Besprechung der Hefezymasen werden wir darauf zurückkommen müssen, und auch bei der Beschreibung der Enzyme der Milchsäurebakterien und anderer Laktose-verbrauchender bzw. -vergärender Bakterien (Coli u. a.) taucht das gleiche Problem auf.

Hier mag aus der Arbeit von Willstätter und Oppenheimer noch folgendes Zitat Platz finden:

„In der lebenden, gärenden Hefe wirkt die Laktase nicht wie in der abgetöteten. Entweder ist die Laktase noch gar nicht in dem (nach Willstätter) quantitativ bestimmten Betrage in der lebenden Hefe vorhanden, entsteht erst nach der Abtötung aus einem Zymogen, oder wahrscheinlicher, die Laktose findet in der lebenden Hefezelle nicht die Bedingungen, unter denen sie der enzymatischen Hydrolyse unterliegt wie unter den für die quantitative Bestimmung ausgewählten." Der Verf. möchte dagegen einst-

[1]) E. F. Armstrong, Proc. Roy. Soc. 73, 516: 1904.

weilen die Auffassung beibehalten, dass die Laktase zum grossen Teil erst bei der Abtötung der Hefe (aus dem Protoplasma, das man in diesem Sinne auch als Zymogen bezeichnen kann) frei gemacht wird.

Enzymbildung.

Dienert[1]) hat eine Reihe von Beobachtungen über die Akklimatisierung der Hefe an verschiedene Kohlehydrate mitgeteilt. Unter anderem hat er auch gefunden, dass bei der Anpassung an das Substrat Laktose die Bildung bzw. die Abscheidung des entsprechenden Enzyms, der Laktase, gefördert wird. Verf. hat die Ergebnisse dieses Forschers nicht durchweg bestätigen können, indessen gewinnen sie durch die neuen Ergebnisse von Willstätter erhöhtes Interesse. Wie Willstätter schreibt, „bieten die Gärwirkungen der Milchzuckerhefen bei quantitativer Beobachtung ihres Verlaufs grosse Unregelmässigkeiten, die sich nur so verstehen lassen, dass die enzymatische Ausrüstung dieser Hefen in hohem Masse veränderlich ist". Ein eingehendes Studium der Enzymbildung, wie es Verf. für die Saccharase begonnen hat (vgl. I. Teil S. 284ff.) führt vielleicht hier zu einer Einsicht in die chemischen Bedingungen der Enzymbildung (Einfluss von N-haltigen Nährstoffen, Anionen, Spuren gewisser Metallionen und Biokatalysatoren).

C. Melibiase.

Substrat: Der aus der Raffinose (S. 204) entstehenden Melibiose, $C_{12}H_{22}O_{11}$, $\alpha]_D = + 143^0$ (wasserfrei), wird von Haworth und Leitch[2]) folgende Konstitution zugeschrieben:

HO CH$_2$ · CH(OH) · CH · CH(OH) · CH(OH) · CH — Galaktoserest
(Ring: CH ... —O— ... CH)
O
CH(OH) · CH(OH) · CH(OH) · CH · CH(OH) · CH$_2$ — Glukoserest.
(Ring: CH(OH) ... —O— ... CH)

Wahrscheinlich synthetisch erhalten von Fischer und E. F. Armstrong[3]).

Vorkommen. Das Enzym ist in den meisten Unterhefen vom Frohberg- und Saaz-Typus, mit einer Ausnahme in allen untergärigen Betriebshefen gefunden worden[4])[5]), scheint aber in Oberhefen zu fehlen, so dass die Fähigkeit zur Vergärung von Melibiose geradezu als Charakteristikum der Unterhefen angesehen wird; Ausnahmen kommen aber in beider Hinsicht vor[6]). Milchzuckerhefen sollen Melibiose nicht vergären. Eine eingehende Untersuchung über die Melibiosespaltung verdankt man A. Bau[5]). Auch

[1]) Dienert, C. r. 129, 63; 1899.
[2]) Haworth und Leitch, Jl Chem. Soc. 113, 188; 1919.
[3]) Fischer und Armstrong, Chem. Ber. 35, 3144; 1902.
[4]) E. Fischer und Lindner, Chem. Ber. 28, 3034; 1895. — A. Bau, Zs. f. Spiritus Ind. 17, 374; 1894.
[5]) Bau, Woch. Brau. 19, 44; 1902 und 20, 560; 1903.
[6]) Siehe hierzu Lafar, Handbuch, IV. Bd., 416ff.

Lindner hat eine grössere Anzahl Hefen auf Melibiosevergärung[1]) hin untersucht. Nachdem nun aber Willstätter bei der Saccharose, Maltose und Laktose eine direkte Vergärung angenommen hat, wird immerhin der Nachweis einer Melibiase durch die Vergärung unsicher.

H. Pringsheim und Zemplén[2]) haben die Melibiosespaltung durch zahlreiche Schimmelpilze mit negativem Resultat untersucht.

Fischer und Armstrong (l. c.) erzielten Melibiosespaltung auch durch Mandel-Emulsin, nicht aber durch Kefirenzyme.

Darstellung. Das Enzym ist in Dauerhefe bzw. Trockenhefe wirksam. Bau l. c. trocknete seine Frohberg-Hefe bei 30—35°, erhitzte sie langsam zweimal 4 Stunden auf 100°. Die unter aseptischen Bedingungen hinzugefügte Melibiose wurde in 14 Tagen bei 28° vollständig gespalten, so dass nur Monosen zugegen waren.

Auch ein wirksamer Hefepresssaft kann dargestellt werden.

Über die optimale Azidität der Melibiase ist noch nichts bekannt.

Den Einfluss der Temperatur hat Bau insofern untersucht, als er an Presssaft eine Optimaltemperatur festzustellen suchte; er gibt an für:

Saccharase	52°
Melibiase	50°
Maltase	40°.

Nach Versuchen mit den Hefen selbst (Erwärmen in 2%iger Zuckerlösung) gibt Bau folgende Tötungstemperaturen an:

Maltase	55°
Melibiase	70°
Saccharase	75°.

Zur Kritik der „Optimaltemperatur“ und „Tötungstemperatur“ siehe Teil I, S. 189 und 196.

Dienert[3]) glaubt eine Anpassung von Hefen an Melibiose festgestellt zu haben.

D. Spaltung synthetischer Gluko-Galaktoside und Galakto-Galaktoside.

Gleichzeitig mit der Biose, welche vermutlich mit Melibiose identisch ist, haben Fischer und Armstrong (Chem. Ber. 35) noch einen weiteren damit isomeren Zucker aus Glukose und Galaktose gewonnen und ferner ein Galakto-Galaktosid.

[1]) Lindner, Woch. Brau. 17, 713; 1900.
[2]) H. Pringsheim und Zemplén, H. 62, 369; 1909.
[3]) Dienert, C. r. 129, 63; 1899.

Über das Verhalten dieser Substanzen zu den in Betracht kommenden Enzymen geben die beiden Forscher folgende Tabelle. Der negative Ausfall des Versuches ist durch einen Horizontalstrich ausgedrückt.

Zucker	Oberhefe	Unterhefe	Emulsin	Kefir-Laktase
Milchzucker	—	—	hydrolysiert	hydrolysiert
Isolaktose	—	vergoren	—	hydrolysiert
Melibiose	—	vergoren	hydrolysiert	—
Galaktosidoglukose . . .	—	vergoren	hydrolysiert	—
Glukosidogalaktose . . .	—	vergoren	hydrolysiert	—
Galaktosidogalaktose . .	—	—	hydrolysiert	—

Sehr bemerkenswert ist ferner die biochemische Synthese zweier Gluko-Galaktoside, welche Bourquelot und Aubry mit Hilfe von Emulsin[2]) durchgeführt haben. Ihre gut definierten kristallisierten Produkte sind mit den von Fischer und Armstrong erhaltenen nicht identisch.

Die von ihnen gewonnenen Galaktoside werden durch Emulsin wieder gespalten, bei der Galaktobiose II verlief sowohl Synthese als Spaltung sehr langsam.

Anhang.

1. Spaltung der Mannotriose.

Mannotriose, $C_{18}H_{32}O_{16}$, Schmelzpunkt 150°, $[\alpha]_D^{20} = 167^0$ entsteht aus Stachyose (S. 208). Wird durch Säuren in 1 Mol. Glukose und 2 Mol. Galaktose gespalten. Man schreibt diesem Zucker folgende Zusammensetzung zu:

$$\overbrace{\text{Glukose — Galaktose}}^{\text{Gluko-Galaktose}}\text{ — Galaktose}$$
$$\text{Glukose — }\underbrace{\text{Galaktose — Galaktose}}_{\text{Digalaktose}}$$

Neuberg und Lachmann erzielten durch Emulsin eine Spaltung in Glukose und Digalaktose.

Nach Bierry tritt durch den Verdauungssaft von Schnecken vielleicht die zweite mögliche Spaltung in Galaktose und Gluko-Galaktose ein.

2. Spaltung der Stachyose.

Das Substrat ist bereits S. 208 und 209 besprochen worden. Der Digalaktoserest geht in die eben erwähnte Mannotriose ein.

[1]) Bourquelot und Aubry, Jl de Pharm. et de Chim. (7) 14, 65; 1916. — 15, 273 1917. Bourquelot, Ann. de Chim. (9) 13, 1; 1920.

[2]) Auch mit getrockneter untergäriger Bierhefe tritt vermutlich eine Synthese von Gluko-Galaktosiden ein.

E. Methoden zur Bestimmung der Galaktoside und ihrer Spaltung.

In erster Linie kommen hier die Methoden in Betracht, durch welche die Hydrolyse des Milchzuckers verfolgt werden kann.

Die polarimetrische Messung, welche bei der Rohrzuckerinversion so ausgezeichnete Dienste leistet, ist zur Bestimmung der Laktosespaltung deswegen wenig geeignet, weil die Drehung im Verlauf der Hydrolyse nur unbedeutend (rund 1 : 1,3) steigt. Dagegen liesse sich die Spaltung der Alkyl-β-Galaktoside polarimetrisch verfolgen.

Eine Bestimmung des Milchzuckers neben den Spaltprodukten kann qualitativ (und schätzungsweise quantitativ) durch Herstellung der Osazone geschehen.

Eine von A. W. van der Haar[1]) vorgeschlagene Methode zur Bestimmung freier und gebundener Galaktose beruht auf der Oxydation dieses Zuckers zu Schleimsäure.

Legrand[2]) versuchte neuerdings eine Methode darauf zu gründen, dass Barfoedsche Lösung nur von den Hexosen, nicht von Laktose reduziert wird.

Reduktionsmethode nach Bertrand[3]).

Bei der Verfolgung der Spaltung mit der Reduktionsmethode ist zunächst zu erwägen, dass sowohl Laktose als seine Produkte Reduktionsvermögen besitzen.

Für reine Laktoselösungen[4]) gibt Bertrand folgende Tabelle.

$$\text{Fünfte Kristallisation: } [\alpha]_D = \frac{+13°63 \times 50 \text{ ccm}}{2{,}500 \text{ g} \times 5 \text{ d}} = +54°5 \ (t = 19°).$$

Der angegebene Drehungswinkel bezieht sich auf das Hydrat: $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O$, die Tabelle dagegen auf das Anhydrid.

Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg
10	14,4	23	32,5	36	50,1
11	15,8	24	33,9	37	51,4
12	17,2	25	35,2	38	52,7
13	18,6	26	36,6	39	54,1
14	20,0	27	38,0	40	55,4
15	21,4	28	39,4	41	56,7
16	22,8	29	40,7	42	58,0
17	24,2	30	42,1	43	59,3
18	25,6	31	43,4	44	60,6
19	27,0	32	44,8	45	61,9
20	28,4	33	46,1	46	63,3
21	29,8	34	47,4	47	64,6
22	31,1	35	48,7	48	65,9

[1]) van der Haar, Biochem. Zs 81, 263; 1917.

[2]) Legrand, C. r. 172, 602; 1921.

[3]) G. Bertrand, Bull. Soc. Chim. 35, 1285; 1906. — Beschreibung der Methode am Ende dieses Buches.

[4]) Reine Laktoselösungen können auch jodometrisch nach der Methode von Willstätter und Schudel (Chem. Ber. 51, 780; 1918) bestimmt werden; diese sehr brauchbare Methode wird am Ende dieses Buches beschrieben.

Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg	Zucker in mg	Cu in mg
49	67,2	67	90,3	85	112,9
50	68,5	68	91,6	86	114,1
51	69,8	69	92,8	87	115,4
52	71,1	70	94,1	88	116,6
53	72,4	71	95,4	89	117,9
54	73,7	72	96,6	90	119,1
55	74,9	73	97,9	91	120,3
56	76,2	74	99,1	92	121,6
57	77,5	75	100,4	93	122,8
58	78,8	76	101,7	94	124,0
59	80,1	77	102,9	95	125,2
60	81,4	78	104,2	96	126,5
61	82,7	79	105.4	97	127,7
62	83,9	80	106,7	98	128,9
63	85,2	81	107,9	99	130,2
64	86,5	82	109,2	100	131,4
65	87,7	83	110,4		
66	89,0	84	111,7		

Willstätter und Oppenheimer[1]) haben die Anwendbarkeit der Bertrand'schen Methode dadurch erhöht, dass sie unter den Verhältnissen der enzymatischen Laktosespaltung Kupferwerte von 10 zu 10% Spaltung ermittelten, indem sie 5%ige Lösungen der Laktose (wasserhaltig) und der äquimolekularen Gemische von Glukose und Galaktose in den verschiedenen Verhältnissen aus Büretten in 25 ccm-Kolben einfliessen liessen, wovon nach Erwärmen auf 30° je 5 ccm entnommen und auf 100 ccm aufgefüllt wurden. Zur Bestimmung dienten 20 ccm. Der Bestimmungsfehler überschreitet nicht ± 0,05 ccm Permanganat, aber dieser Differenz entspricht schon ein Unterschied von ± 2,5% Laktosespaltung.

Kupferzahlen der Gemische von Laktose und Glukose + Galaktose.

Laktose ccm	Glukose + Galaktose ccm	0,160 n. Perm. ccm	Cu (Mittel) mg
1,0	0	6,10; 6,15	62,35
0,9	0,1	6,30; 6,35	64,35
0,8	0,2	6,60; 6,65	67,45
0,7	0,3	6,90; 6,90	70,2
0,6	0,4	7,15; 7,15	72,8
0,5	0,5	7,45; 7,50	76,15
0,4	0,6	7.65; 7,70	78,15
0,3	0,7	8,09; 8,09	82,3
0,2	0,8	8,38; 8,38	85,3
0	1,0	9,00; 9,00	91,6

[1]) Willstätter und Oppenheimer, l. c.

Willstätter und Oppenheimer setzten ihre Versuche mit Laktase folgendermassen an: 25 ccm 10%iger Laktoselösungen mit 10 ccm $^1/_8$ mol. Phosphatmischung, wurden mit Enzym und Wasser auf 50 ccm gebracht. Reaktionstemperatur 30°. Proben von 5 ccm wurden in 5 ccm 2 n-Soda sistiert; $^1/_5$ der Mischung wurde zur Kupferbestimmung verwendet. Der Sodazusatz ist ohne Einfluss auf die Permanganatmengen.

Definition der Wirksamkeit.

Die Wirksamkeit des Mandelemulsins kann durch die Reaktionskonstante der Lösung und die angewandte Menge Enzympräparat bestimmt werden.

Bei der Hefenlaktase sind die Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung nicht konstant. Man ist hier auf die Festlegung eines Zeitwertes unter ganz bestimmten Bedingungen angewiesen. Willstätter misst die Wirksamkeit durch den Zeitwert in Minuten, welchen 1 g trockene Hefe oder die dieser Menge entsprechende Enzymlösung (vgl. S. 291) brauchen würde, um bei 30° und optimalem pH (= 7) in 50 ccm Lösung 2,5 g Laktose zu hydrolysieren.

Dass sich Laktase in frischer Hefe nicht, wie die Saccharase, direkt bestimmen lässt, ist bereits S. 291 erwähnt worden.

Kapitel 11.

Sinigrinase.

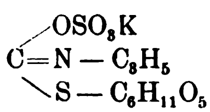
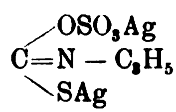
Unter den Senföl-Glukosiden ist Sinigrin (myronsaures Kalium) aus Brassica nigra das bekannteste; ihm reihen sich mehrere andere an, welche bei der Spaltung ebenfalls Isothiocyanate liefern. Diesen Glukosiden entspricht zweifellos ein ihnen spezifisches Enzym (evtl. eine Enzymgruppe).

Bezüglich der Bezeichnung dieses Enzyms herrscht einige Verwirrung. Oft hat man dasselbe, dem Entdecker Bussy folgend, Myrosin genannt; später hat man diesen Namen, dessen Bildung eher auf ein Glukosid hindeutet, in Myrosinase verwandelt (Oppenheimer). Da aber das hauptsächliche Substrat Sinigrin ist, möchte ich vorschlagen, dem gebräuchlichen v. Lippmann angegebenen Nomenklaturprinzip gemäss, die Bezeichnung Sinigrinase allgemein anzunehmen.

Substrat: Das Sinigrin oder myronsaure Kalium (Will und Körner) Schmelzpunkt 126—127°, $[\alpha]_D = -15,5^0$ wird, wie durch die Untersuchungen von Gadamer[1]) nunmehr feststeht, unter dem Einfluss des Enzyms nach folgender Formel gespalten:

$$\underset{\text{Sinigrin}}{C_{10}H_{16}O_9NS_2K} + H_2O = \underset{\text{Allylsenföl}}{C_3H_5 \cdot N:CS} + \underset{\text{Glukose}}{C_6H_{12}O_6} + \underset{\text{Kaliumbisulfat.}}{KHSO_4}.$$

Die Konstitution ist nach Gadamer folgende (I):

I   II

Auch durch die Isolierung der Thioglukose von Schneider und Wrede wird diese Formel gestützt (Chem. Ber. 47, 1258; 1914).

Versetzt man die wässrige Lösung mit Silbernitrat, so entsteht unter Abspaltung von Glukose Senfölsilbersulfat = sinigrinsaures Silber (II).

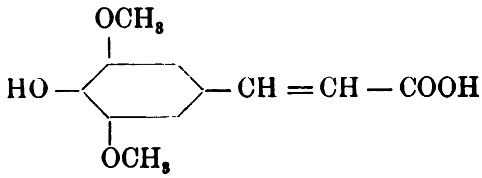
Eine ähnliche Konstitution (I) kommt nach Gadamer[2]) dem Sinalbin aus Sinapis alba zu:

---

[1]) Gadamer, Arch. d. Pharm. 235, 44; 577; 1897. — Chem. Ber. 30, 2322; 1897. — 32, 2335; 1899.

[2]) Gadamer, Chem. Ber. 30, 2327; 1897.

I $C \begin{cases} OSO_2 \cdot O \cdot C_{16}H_{24}NO_5 \\ =N - CH_2 \cdot C_6H_4 \cdot OH \\ S - C_6H_{11}O_5 \end{cases}$


II

Es zerfällt in Glukose, Sinalbinsenföl und saures schwefelsaures Sinapin; das Sinapin ist ein Ester der Sinapinsäure (II) mit Cholin, und erstere kann als Abkömmling der Gallussäure aufgefasst werden.

Auch bei einigen weiteren Glukosiden ist — besonders durch Gadamer — die Senfölkomponente erkannt:

Glukosid aus	Tropaeolum majus und Lepidium sativum	enthält	Benzylsenföl [1])
„	„ Cochlearia	„	sek. Butylsenföl [2])
„	„ Nasturtium off. und Brassica rapa	„	Phenyläthylsenföl [3])

Schliesslich ist noch das durch die Arbeiten von W. Schneider[4]) bekannt gewordene Cheirolin-Glukosid aus Cheiranthus (Goldlack) zu erwähnen. Auch dieses liefert bei der enzymatischen Spaltung ausser Glukose und Cheirolin noch Schwefelsäure und Kalium. Das Cheirolin ist ein Senföl von der Zusammensetzung[5]):

$$\text{Cheirolin} \quad CH_3 - SO_2 - CH_2 - CH_2 - CH_2 - NCS$$
$$\text{Allylsenföl} \quad CH_2 = CH - CH_2 - NCS.$$

Die unten stehende Formel des Allylsenföls veranschaulicht den nahen Zusammenhang zwischen beiden Stoffen.

Auch Homologe dieses Glukosids sind von Schneider[6]) synthetisiert worden.

Vorkommen. Charakteristisch ist die Sinigrinase für die Cruciferen, bei welchen sie mit den Senfölglukosiden besonders in den Samen, aber auch in verschiedenen Organen vorkommt. Sie ist aber nicht auf diese Familie beschränkt. Spatzier hat den Eintritt der Spaltung nach dem Senfölgeruch beurteilt und fand das Enzym ausserdem sowohl in Samen als in oberirdischen Organen der zur gleichen Ordnung gehörenden Resedaceen, ferner in Samen bei den Familien der Violaceen und Tropaeolaceen.

Bokornys[7]) Angabe, dass Sinigrinase in Hefen vorkommt, wurde von Neuberg und Färber[8]) weder in untergäriger Münchener Trockenhefe noch

[1]) Gadamer, Chem. Ber. 32, 2335, 1899. — Oxybenzylsenföl nach Beijerinck, Zbt f. Bakt. II, 5, 429; 1899.
[2]) Gadamer, Arch. d. Pharm. 239, 283; 1901.
[3]) Gadamer, Arch. d. Pharm. 237, 510; 1899. — Kunze, Arch. d. Pharm. 245, 660; 1908
[4]) W. Schneider und Lohmann, Chem. Ber. 45, 2954; 1912.
[5]) W. Schneider, Lieb. Ann. 375, 218; 1910.
[6]) W. Schneider, Lieb. Ann. 386, 346; 1912.
[7]) Bokorny, Biochem. Zs 75, 376; 1916.
[8]) Neuberg und Färber, Biochem. Zs 78, 264; 1917.

in dessen Mazerationssaft noch in frischer Berliner Ober- und Unterhefe bestätigt gefunden. Auch Kossovicz hatte 1905 mit Hefen keine Sinigrinspaltung erzielt.

Guignard[1]) hat das Enzym ausserdem in Capparidaceen und sonst noch in einigen zu den Dikotylen gehörenden Familien gefunden, Bokorny in Leguminosen, Umbelliferen und Liliifloren. Was die von Guignard hierbei angewandte Methodik betrifft — sie stützt sich auf eine Beobachtung von Heinricher aus dem Jahr 1886 — so gibt dieselbe allerdings zu Bedenken Anlass und eine erneute kritische Untersuchung erscheint notwendig. Bezüglich der Verteilung des Enzyms in den Pflanzen kam Guignard zu folgenden Ergebnissen:

Wurzeln enthalten das Enzym besonders in der Rinde.

Stämme enthalten in der Rinde, im Pericykel und den davon abstammenden Geweben am meisten Enzym.

Blätter weisen sich besonders enzymhaltig bei einigen Papayaceen.

Blüten enthalten Sinigrinase z. B. bei Tropaeolum. Bei den Cruciferenblüten fand Guignard das Enzym in den Fruchtblättern.

Auch Spatzier[4]) hat durch Farbenreaktionen die Lokalisation des Enzyms näher studiert; bezüglich der Verbreitung der „Myrosinschläuche" sei auf das Original verwiesen.

Wirksamkeitsbereich. Es liegen bis jetzt keine Angaben vor, welche ungleiche Sinigrinasen in verschiedenen Pflanzen vermuten lassen[2]). Andererseits ist die Einheitlichkeit der bis jetzt gewonnenen Enzymlösungen nicht garantiert; es ist noch nach den einzelnen Komponenten zu suchen. Wichtig ist der von E. Fischer[3]) geführte Nachweis, dass Sinigrinase weder α- noch β-Methylglukosid angreift. Andererseits ist β-Phenylglukosidase (Emulsin) unwirksam gegen die Senfölglukoside.

Darstellung. Guignard zerkleinerte weisse Senfsamen und liess sie mehrere Stunden mit Wasser bei 40° stehen. Das Filtrat wurde auf 70° erhitzt, um den grössten Teil der Eiweisstoffe zu koagulieren. Nach Filtration wurde das Enzym durch das doppelte Volum 90%igen Alkohols abgeschieden, filtriert, getrocknet und mit Äther gewaschen.

Etwas anders verfuhren z. B. Schneider und Lohmann (l. c. 2960): „Der klare wässrige Auszug von 200 g weissem Senfmehl wurde durch Zusatz des gleichen Volumens Alkohol ausgefällt. Der abfiltrierte, ausgewaschene Niederschlag wurde dreimal mit Äther zur Entfernung mitgerissenen Sinalbin-Senföls ausgeschüttelt und dann hieraus der wässrige, myrosinhaltige Auszug hergestellt; die sauer reagierende Enzymlösung wurde dann neutralisiert.

Wirkungsbedingungen. Bei der Sinigrinspaltung bildet sich saures Sulfat, die Azidität der Lösung steigt also stark. Gadamer (Arch. 235) gibt

[1]) Guignard, Jl de Bot. 4, 385, 412, 435; 1890. — 6; 1893. — C. r. 111, 249, 920; 1890. Bull. Soc. Bot. France (3) 1, 418; 1894.

[2]) Smith, H. 12, 422; 1886. — Siehe hierzu auch z. B. die Beobachtung von Schneider (Chem. Ber. 45, 2955), dass das Enzym des Samens von Goldlack (Cheiranthus cheiri) das Sinigrin des schwarzen Senfs spaltet; umgekehrt gelang die Hydrolyse des Cheirolinglukosids durch Sinigrinase aus weissem Senf.

[3]) E. Fischer, Chem. Ber. 27, 3483; 1894.

[4]) Spatzier, Jahrb. wiss. Bot. 25, 93; 1893.

an, dass man, um eine Hemmung der Spaltung zu vermeiden, von Zeit zu Zeit die entstehende Säure abstumpfen muss. Ob aber Neutralität optimal ist, lässt sich noch nicht sagen.

Paralysatoren. Guignard fand, dass die hemmende Wirkung von Salizylsäure und von Chloral erst bei Mengen einsetzt, welche 1% übersteigen. Ähnliches gilt nach Bokorny (Chem. Ztg. 24) für Formaldehyd, Hydroxylamin u. a. Tonerde und Borax sollen bei 8% unschädlich sein. 1% Tannin hemmt stark. Die zur Vergiftung nötigen Mengen (auch $AgNO_3$ usw.) hängen natürlich vom Reinheitsgrad des Enzyms bzw. von der Art der Verunreinigungen ab.

Kinetik. Über den Verlauf der enzymatischen Sinigrinspaltung liegen einige Versuche von Tammann[1]) vor.

Einfluss der Temperatur. Soweit sich aus den Versuchen von Guignard und Bokorny, die orientierenden Charakter haben, etwas entnehmen lässt, soll Sinigrinase ein verhältnismässig thermostabiles Enzym sein.

Nachweis der Sinigrinspaltung. Der zeitliche Verlauf liesse sich vielleicht durch Bestimmung des abgespaltenen Sulfats ermitteln. Im übrigen sei auf die Methodik Schneiders (z. B. Chem. Ber. 45, S. 2960) verwiesen.

Anhangsweise sind noch die negativen Ergebnisse zu erwähnen, welche bis jetzt bezüglich der

Spaltung von Thiophenolglukosiden und von S-haltigen Biosen

erhalten worden sind.

Thiophenolglukoside haben E. Fischer und Delbrück[2]) synthetisiert; sie gehören vermutlich zur β-Reihe. Zu Spaltungsversuchen wurde Emulsin angewandt, das sich aber unwirksam erwies. Das Verhalten zu Sinigrinase scheint noch nicht geprüft zu sein.

In diesem Zusammenhang mag erwähnt sein, dass Thiophenol-Laktosid von Emulsin in der Biosegruppe unter Bildung einer reduzierenden Hexose angegriffen wird.

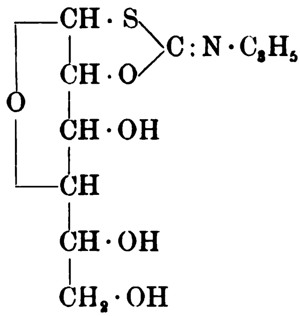
Auf das sehr interessante, von W. Schneider[3]) erhaltene Phenyl-thiourethan-d-Glukosid

$$C_6H_5 \cdot N : C \begin{cases} S \cdot C_6H_{11}O_5 \\ OC_2H_5 \end{cases}$$

ist Sinigrinase geprüft worden, aber auffallenderweise ohne Erfolg. Der gleiche Forscher hat aus dem Sinigrin ein sulfatfreies, bemerkenswertes Produkt erhalten, das er Merosinigrin nennt und folgendermassen formuliert (Chem. Ber. 47, 2226).

---

[1]) Tammann, H. 16, 271; 1892.
[2]) Fischer und Delbrück, Chem. Ber. 42, 1476; 1909.
[3]) W. Schneider und Clibben, Chem. Ber. 47, 2223; 1914.



Ohne Einwirkung ist Sinigrinase auf die von Schneider[1]) gewonnenen α- und β-Alkyl-Thioglukoside, z. B. Methylthioglukosid, $C_6H_{11}O_5 \cdot S \cdot CH_3$. Auch Emulsin bzw. Hefenenzyme vermögen nicht zu spalten.

Schliesslich haben Schneider und Wrede[2]) vergeblich versucht, ihre Thio-Isotrehalose durch Sinigrinase zu spalten, und auch hier zeigte weder Emulsin noch Hefenmaltase noch Trehalase eine Wirkung.

---

[1]) Schneider, Sepp, Stiehler, Chem. Ber. 51, 220; 1918.

[2]) Schneider und Wrede, Chem. Ber. 50, 793; 1917. — Siehe auch Wrede, H. 112, 1; 1920.

Kapitel 12.

Tannase.

Nach den eigentlichen Glukosidasen wird hier zum Schluss als besonderes Enzym die Tannase behandelt. Wie die in den vorhergehenden Kapiteln besprochenen Enzyme macht die Tannase zwar auch Glukose frei, aber die Reaktion ist eine andere insofern, als es sich hier im wesentlichen nicht um die Lösung einer Glukosidbindung[1]) handelt. Schon Fischer und Bergmann[2]) haben die Verschiedenheit von der Glukosidasespaltung in Betracht gezogen; sie schreiben: „Mancher wird geneigt sein, darin (in der Spaltung der 1-Galloylglukose) eine vollkommene Analogie mit der enzymatischen Spaltung der gewöhnlichen Glukoside zu sehen. Da aber das Emulsin ein Gemisch verschiedener Enzyme ist, so besteht noch die Möglichkeit, dass die Abspaltung des Galloyls von einem besonderen Enzym, etwa einer Esterase, bewirkt wird. Die Entscheidung der Frage, welches Enzym die Hydrolyse der 1-Galloylglukose verursacht, erfordert eine besondere Untersuchung, die wir bisher nicht unternehmen konnten.“ Seitdem hat sich Freudenberg, dem man die wichtigsten Beiträge zur Kenntnis der Tannase verdankt, dahin entschieden, dass die Tannase gerade durch ihre Fähigkeit zur Esterspaltung charakterisiert ist[3]).

Andererseits liegen auch noch keine genügenden Anhaltspunkte dafür vor, dass das Enzym, welches Galloylglukose spaltet, den Lipasen so nahe verwandt ist, dass sie zu diesen gezählt werden müsste. Wie Freudenberg und Vollbrecht[4]) neuerdings hervorheben, sind die Tannasepräparate Enzymgemische, in welchen die Fähigkeit zur Spaltung des Rohrzuckers, der Cellobiose, Maltose, Stärke und des Inulins sowie eines Rhamnosids nachgewiesen werden konnte.

---

[1]) Über die Bezeichnung Glukosid siehe S. 233.

[2]) E. Fischer u. Bergmann, Chem. Ber. 51, 1760; 1918. — Fischer, Depside S. 349.

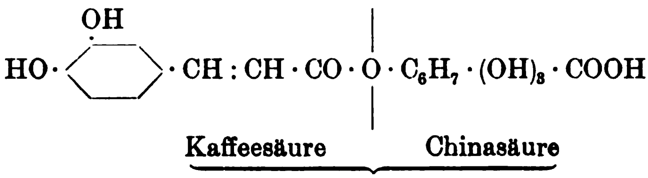
[3]) In Beziehung zur Tannase steht vielleicht die „Hadromase“, welche u. a. auch Esterspaltende Komponenten zu enthalten scheint; Czapeks' Hadromal ist hypothetisch (vgl. S. 76); der enzymatische Abbau des Holzes verdient nähere Untersuchung.

[4]) Freudenberg u. Vollbrecht, H. 116, 277, 1921.

Ältere Arbeiten: 1786 hatte Scheele Gallussäure in Galläpfeln gefunden. Robiquet nahm 1837 an, dass die Zersetzung der Galläpfel durch ein in diesen enthaltenes Enzym bewirkt wird. Später hielt er[1]) das aus den Galläpfeln extrahierte Enzym Pektase für das Gallussäure abspaltende Agens. Den Nachweis, dass die Abspaltung der Gallussäure und Glukose (im wesentlichen) nicht durch ein Enzym der Galläpfel, sondern durch Pilze, und zwar durch den von ihm beschriebenen Aspergillus niger und durch Penicillium glaucum bewirkt wird, verdankt man van Tieghem[2]).

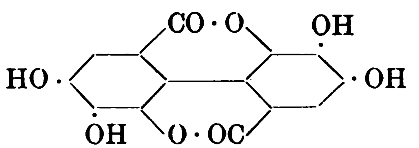
1901 extrahierten Fernbach[3]) und Pottevin[4]) Tannase aus Aspergillus; sie fanden diesen Pilz reich an Tannase, falls man in der Raulinschen Nährlösung den Zucker durch Tannin bzw. durch Gallussäure ersetzt.

Substrat. Die hier in Betracht kommenden natürlichen Substrate hat Freudenberg[5]) als „hydrolysierbare Gerbstoffe" den „kondensierten" Gerbstoffen gegenübergestellt. Unter den hydrolysierbaren Gerbstoffen sind zu nennen das „türkische" (aus Quercus infectoria) und das „chinesische" Tannin, die Chebulinsäure, das Hamameli-Tannin und der gerbstoffartige Anteil der Kaffeebohnen, die Chlorogensäure[6]).



Chlorogensäure

Übergänge zwischen den beiden Hauptgruppen der Gerbstoffe liegen vor im Eichen-Gerbstoff[7]), im Holzgerbstoff der Edelkastanie[8]) u. anderen, in welchen Gallussäure und besonders Ellagsäure mit kondensierten Systemen esterartig verbunden sind.



Ellagsäure.

Unter den synthetischen Substraten müssen als typisch hier genannt werden:

---

[1]) Robiquet, Ann. de Chim. et de Phys. (3) 39, 453; 1853.

[2]) van Tieghem, C. r. 65, 1091; 1867.

[3]) Fernbach, C. r. 131, 1214; 1901.

[4]) Pottevin, C. r. 131, 1215; 1901.

[5]) Siehe K. Freudenberg, Die Chemie der natürlichen Gerbstoffe. Berlin, Springer 1920. Ferner Kollegium 1921, 11. — Zs angew. Chem. 34, 247; 1921. — Abderhaldens Handb. d. biolog. Arbeitsmethoden S. 471.

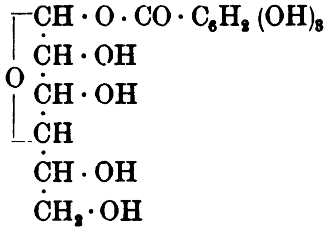
[6]) Freudenberg, Chem. Ber. 53, 232; 1920.

[7]) Vollbrecht, Kollegium 1921, 394 u. 418.

[8]) Freudenberg u. Walpuski, Chem. Ber. 54, 1695; 1921.

Die 1-Galloyl-β-Glukose (= Glucogallin v. Gilson), Schmzp. 214—215° korr., $[\alpha]_D^{18} = -24,5$, für welche Fischer und Bergmann[1]) die Formel (I) aufgestellt haben. Ihr entspricht eine 1-Galloyl-α-Glukose.

(I)

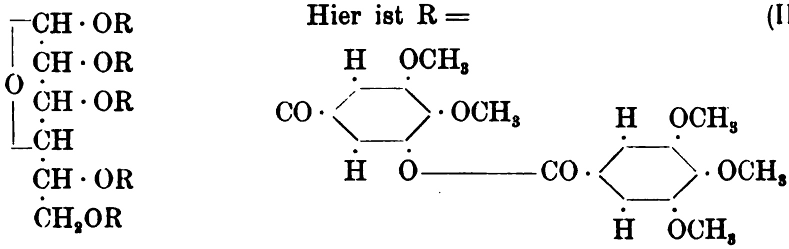


Die höheren Galloylglukosen bis zur Penta-Galloylglukose

$$[(HO)_3C_6H_2 \cdot CO]_5C_6H_7O_6,$$

besonders die Penta-(m-digalloyl)-β-glukose, sind interessant wegen ihrer nahen Beziehung zum chinesischen Tannin. Die Penta-[pentamethyl-m-digalloyl]-Glukose (II) ist nämlich dem von Herzig[2]) erhaltenen Methylotannin sehr ähnlich.

(II)

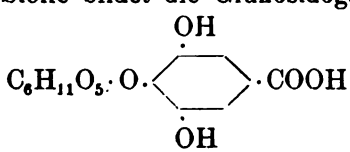


Besonders hervorzuheben sind auch die kristallisierten und infolgedessen gut definierten Gerbstoffe, und zwar ausser dem Hamameli-Tannin[3]), welches wahrscheinlich eine Digalloylhexose ist, noch die Digalloylglukose aus Chebulinsäure.

Der einfachste Vertreter der diesen Stoffen zugrunde liegenden Ester ist der schön kristallisierende Methylester der Gallussäure, welchen Freudenberg und Vollbrecht neuerdings zur quantitativen Bestimmung der Tannase angewandt haben (siehe S. 311 u. 313).

Eingehender und gesondert zu studieren wäre noch die enzymatische Spaltung der Estergruppierung in den Hexose-freien Didepsiden vom Typus der m-Digallussäure z. B. in der o-Diorsellinsäure[4]).

Schliesslich kommen die reinen Monogalloyl-Glukoside in Betracht. Den Grundtypus für diese Stoffe bildet die Glukosidogallussäure,



[1]) J. Fischer u. Bergmann, Chem. Ber. 51, 1760; 1918.

[2]) Herzig, Chem. Ber. 38, 989; 1905. — Monatsh. f. Chem. 30, 543; 1909.

[3]) K. Freudenberg, Chem. Ber. 52, 177; 1919.

[4]) E. Fischer und Hermann Fischer, Chem. Ber. 47, 505; 1914.

welche durch Emulsin gespalten wird[1]). Glukose findet sich in natürlichen Gerbstoffen auch in echter Glukosidbindung (z. B. im Eichengerbstoff)[2]).

Über die verschiedenen Tannine siehe Freudenbergs Monographie S. 78 u. ff. Besonders sei auch auf die beiden zusammenfassenden Abhandlungen von E. Fischer[3]) verwiesen.

Vorkommen. Wie schon erwähnt, wurde Tannase in Penicillium glaucum und besonders in Aspergillus niger gefunden. Natürlich sind dies nicht die einzigen Vertreter aus der grossen Familie der Aspergillaceen, in welchen sich die Fähigkeit zur Spaltung von Gallussäureestern findet oder hervorgerufen werden kann. Systematische Versuche fehlen noch. In höheren Pilzen scheint das Enzym seltener aufzutreten[4]).

Das auf Gerbstoffe eingestellte Enzym wird in den Aspergillaceen und demgemäss auch in ihren Extrakten von vielen anderen Enzymen begleitet; gerade die Schimmelpilze sind ausserordentlich reich an den verschiedensten Enzymen, wie z. B. aus den Arbeiten von A. W. Dox[5]) hervorgeht[6]). Deswegen ist auch die Unterscheidung und Trennung, die „biologische Reinigung", hier sehr schwer. Der chemischen Reaktion nach wäre das Enzym, welches z. B. Gallussäuremethylester spaltet, eine Esterase. Nun kommen in Schimmelpilzen Enzyme vor, welche sowohl Ester aliphatischer Fettsäuren als auch eigentliche Fette und Öle spalten. Man findet Angaben darüber z. B. bei Sigmund[7]), ferner bei Camus[8]) und Pottevin. Über die Spezifizität der Tannase, evtl. der Tannasen lässt sich also noch nichts sagen und ihr Wirkungsbereich muss erst festgestellt werden.

An der 1-Galloylglukose haben Fischer und Bergmann (Fischer, Depside, S. 388) den Einfluss einiger typischen Enzympräparate eingehend untersucht:

Emulsin wirkt wie bei den β-Glukosiden. Die durch die Spaltung frei werdende Gallussäure verzögert gegen Ende stark. Durch Kalziumkarbonat kann schädlicher Säureüberschuss vermieden werden, aber dadurch verändert sich die Drehung der Lösung schon ohne Enzym.

Phaseolunatase oder Linase (vgl. S. 251) aus Phaseolus-Bohnen erwies sich aktiv, ebenso Auszug aus untergäriger Hefe.

Lösung von 0,3325 g lufttrockener 1-Galloylglukose in 14 ccm Hefenauszug (geprüft gegen α-Methylglukosid) wurde mit 0,33 g $CaCO_3$ und Toluol unter Schütteln bei 34° aufbewahrt. Drehung (im 5 cm-Rohr) — 0,29°, betrug nach 24 Stunden — 0,08° und nach 3 Tagen + 0,15°. Aus der Lösung werden nun 0,090 g Gallussäure isoliert.

---

[1]) Fischer und Bergmann, Chem. Ber. 51, 1804; 1918.

[2]) Freudenberg, Privatmitteilung.

[3]) E. Fischer, Chem. Ber. 46, 3253; 1913 und 52, 809; 1919.

[4]) Siehe z. B. Hasenöhrl und J. Zellner, Monatsh. 43, 21; 1922.

[5]) A. W. Dox, Bull. 110. B. An. Ind. U.S. Dept. Agric. 1910. — Jl Biol. Chem. 6, 461; 1909 u. a.

[6]) Siehe auch die Monographie von Wehmer in Lafars Handb. 2. Aufl. IV, 192.

[7]) Sigmund, Sitz.-Ber. Wien. Akad. d. W. 101, 549; 1892.

[8]) Camus, Soc. Biol. 49, 192; 1897. — Harriot u. Camus, C. r. 124, 235; 1897.

Die Wirkung der Hefe auf Tannin ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Biddle und Kelley[1]) haben in 4% Tanninlösung durch eine Reinkultur von Hefe Gärung hervorrufen können, indessen verschwanden die Gerbstoffreaktionen nicht. Man kann daraus schliessen, dass die Didepsidbindung durch Hefenenzyme nicht gelöst wird, wohl aber die Esterbindung zwischen Gallussäure und Zucker. Dies steht im Einklang mit dem Befund, dass Galloylglukose durch Emulsin (β Glukosidase) gespalten wird, nachdem nachgewiesen ist, dass Kulturhefen β-Glukosidase enthalten. Es deutet auch darauf hin, dass die Esterbindung zwischen Zucker und (aromatischen) Karbonsäuren der β-Glukosidbindung zwischen Zucker und Phenolresten konstitutiv nahe steht.

Digalloylglukose wird dagegen, wie Freudenberg und Fick[2]) feststellten, weder von Emulsin, Phaseolunatase noch von Hefenauszug angegriffen. Die genannten Forscher schliessen daraus, dass keiner der beiden Gallussäurereste mit dem Zucker in derselben Beziehung steht, wie die Gallussäure in der 1-Galloyl-β-Glukose. „Vielleicht liegt ein Derivat der α-Glukose vor, wahrscheinlich aber ist die 1-Stellung des Zuckers unbesetzt. Vermutlich haftet an dieser Stelle die Spaltsäure."

Enzymbildung. Während es zweifelhaft ist, ob die künstliche Hervorrufung artfremder Enzyme in Mikroorganismen während kürzerer Perioden überhaupt schon gelungen ist, liegen zahlreiche Beobachtungen und eine Reihe von Untersuchungen vor, welche zeigen, dass viele niedere Organismen durch geeignete Züchtungs- und Ernährungsbedingungen zu gesteigerten Enzymwirkungen bzw. gesteigertem Enzymgehalt per Zelle gebracht werden können. Allerdings haben gerade die Versuche zur „Anpassung an Nährsubstrate" und also zur Bildung des dem ungewohnten Substrat entsprechenden Enzyms bei Hefen oft nicht zum erwarteten Resultat geführt, wie eine kritische Sichtung der Literatur zeigt. Bei den Aspergillaceen aber sind die starken Veränderungen, welche schon durch geringe — zuweilen minimale — Variationen der Nährlösung eintreten, sehr auffallend.

Als festgestellt kann die schon von Fernbach und von Pottevin beobachtete Tatsache betrachtet werden, dass die Fähigkeit von Aspergillus niger zur Tanninspaltung dadurch steigt, dass dieser Pilz auf Nährlösungen gezüchtet wird, welchen Tannin (oder ähnliche Gerbstoffe, oder auch Derivate der Gallussäure an Stelle von Kohlehydraten) zugesetzt worden sind. Gleichzeitig nimmt das Wachstum des Pilzes zu, und auch der Gehalt an gewissen anderen Enzymen, welcher übrigens bei weitem nicht so konstant ist wie bei der Hefe[3]), steigt.

Welche Mengen zu diesem Zweck einer Nährlösung, z. B. Czapeks, zugesetzt werden dürfen, ohne dass die Steigerung in eine Hemmung der

[1]) Biddle und Kelley, Jl Amer. Chem. Soc. 34, 919; 1912.
[2]) Freudenberg u. Fick, Chem. Ber. 53, 1728, 1920.
[3]) Euler, Fermentf. 4, 242; 1921.

Tannasebildung und des Zuwachses übergeht, ist eine Frage, die nicht ohne praktisches Interesse ist. Lewis Knudson[1]), der daraufhin eine Anzahl von Aspergillaceen und Mucoraceen untersucht hat, kommt zum Resultat, dass Aspergillus niger, Aspergillus flavus und Penicillium sp. Tanninzusätze am besten vertragen. Aspergillus produziert mehr Tannase als Penicillium.

In einer Nährlösung, welche als Kohlenstoffquelle 2% Tannin enthält, erniedrigt nach Knudson ein Rohrzuckerzusatz die Abscheidung der Tannase. „Tannin ist als Stimulans für Tannasebildung wirksamer als Gallussäure. In einer Nährlösung, welche 10% Zucker enthält, nimmt die Tannasebildung mit der Konzentration der Gallussäure zu."

Freudenberg und Vollbrecht (l. c.) haben ihren Nährlösungen statt Tannin die billigeren Myrobalanen zugesetzt. Sie geben folgende Vorschrift:

600 g grob gemahlene Myrobalanen werden in 3 l Leitungswasser 10 Minuten gekocht, danach wird abgegossen und der Rückstand 3—4 mal mit je 2 l heiss ausgezogen. Die Flüssigkeit wird mit der Lösung von 300 g Ammoniumsulfat, 9 g Dikaliumphosphat und 3 g Magnesiumsulfat versetzt und auf 12 Liter aufgefüllt. Mit der Lösung werden flache Schalen derart angefüllt, dass die Schichtdicke mindestens 4 cm beträgt. Auf dünnerer Schicht wächst der Pilz schlecht. Nach dem Animpfen mit Aspergillus niger bleibt die Flüssigkeit leicht bedeckt im Dunkeln bei 28—32° stehen. Nach etwa 4 Tagen wird der mit einem Anflug von Sporen überzogene Pilz abgehoben, mit 6 mal erneuertem Wasser durchgeknetet und jedesmal mit der Hand ausgepresst. Diese Massnahme erleichtert die spätere Filtration.

Darstellung. „Der feuchte Pilz wird mit 1 Liter Wasser und 1 ccm Toluol zu einem dünnen Brei angerieben und 24 Stunden unter häufigem Umrühren bei 20° sich selbst überlassen. Während der ersten 8—10 Stunden tritt Säure aus; sie wird alle 2—3 Stunden mit kalt gesättigter Bariumhydroxydlösung (insgesamt etwa 10 ccm) vorsichtig abgestumpft. Durch diese Massnahme, die der Maltasebereitung (Neutralisationsverfahren) von Willstätter, Oppenheimer und Steibelt (vergl. S. 154) nachgebildet ist, erhöht sich die Ausbeute an Tannase auf das Vielfache. Nun wird durch eine Lage Kieselgur abgesaugt und gewaschen. Das Mycel wird erneut mit 1/2 Liter Wasser und 1/2 ccm Toluol angerührt und nach 2 Stunden abfiltriert. Die vereinigten Auszüge werden im Vakuum auf 50—60 ccm eingeengt, durch Kieselgur geklärt und mit dem 5fachen Volum absoluten Alkohols versetzt. Die Tannase fällt in hellen Flocken, die sich nach einigem Schütteln filtrieren lassen. Das Präparat wird noch 2 mal in 20—30 ccm Wasser gelöst und mit dem 5 fachen Volum absoluten Alkohols gefällt. Zuletzt wird mit Alkohol, dann mit Äther nachgewaschen und im Exsikkator getrocknet. Falls das hellgraue Pulver Fehlingsche Lösung reduziert, muss es nochmals umgefällt werden. Ausbeute 2,5—3,5 g vom Spaltwert 35."

[1]) Lewis Knudson, Jl Biol. Chem. 14, 159; 1913.

Wirkungsbedingungen. Da bei der Spaltung des Gallussäuremethylesters die Gegenwart von Puffern die Schärfe der Titration herabsetzt, haben Freudenberg und Vollbrecht solche Mittel nicht verwendet und dadurch auch das Aziditätsoptimum noch nicht genau festgelegt. Jedenfalls ist die Tannase in saurer Lösung noch wirksam, wird aber durch grossen Säureüberschuss gehemmt. Die der Tannase beigemengten Salze beeinflussen den Gang des Abbaus nicht.

Bei der Zuckerabspaltung aus Gerbstoffen ist zu beachten, dass Tannin die Wirkung der β-Glukosidase nicht unerheblich hemmt.

Kinetik.

Da Freudenberg die Wirksamkeitsbestimmung der Tannase auf die Spaltung des Gallussäuremethylesters — eines in mancher Hinsicht zweifellos sehr geeigneten Substrates — gründen will, hat er mit Vollbrecht zunächst den Verlauf der Hydrolyse dieses Esters und des Tannins verglichen.

Die folgende Tabelle bezieht sich auf 1,000 g Tannin, 1,082 g Gallussäuremethylester und 1,423 g Digalloylglukose. Diese Stoffe wurden wasserfrei gewogen und in 300 ccm Wasser gelöst; jede Lösung gibt nach beendetem Abbau 1/3 % Gallussäure, eine Konzentration, die sich früher bewährt hatte. Titration in 20 ccm. Toluolzusatz. Temp. 30°. Gleiche Enzymmengen.

Abbau in %.

Stunden	10	24	48	72	168
Digalloylglukose .	19,2	29,9	40,0	48,5	74,0
Ester.	13,1	20,5	29,9	37,4	64,5
Chin. Tannin . . .	8,0	11,0	13,5	23,7	81,0

Wie man sieht, ist die Grössenordnung der Spaltung bei allen 3 Substraten die gleiche. Was den Verlauf betrifft, so liegt die Wirkung auf den Gallussäuremethylester bis zu etwa 50% Spaltung zwischen der Wirkung auf Tannin und auf Digalloylglukose. Bei anderen Tannasepräparaten und bei 40° wurden die gleichen Verhältnisse gefunden. Beeinflusst wird der Verlauf natürlich dadurch, dass die Azidität der Lösung mit der Zeit steigt.

Über den Einfluss der Konzentration wurden zwei Versuchsreihen mit verschiedenen Enzympräparaten angestellt, wobei Esterlösungen von 1/3, 1/2, 1 und 2 Gallussäureprozenten mit so viel Tannase angesetzt wurden, dass stets die gleiche Menge Enzym auf 1,082 g Ester kam.

„Die Geschwindigkeit steigt mit der Verdünnung und erreicht bei 1/2% den Höhepunkt.“ Weitere Verdünnung wirkt nicht beschleunigend, sondern eher verzögernd auf den Abbau.

Beziehung zwischen Enzymmenge und Umsatz.

„Der Abbau folgt nicht dem Gang der monomolaren Reaktion; selbst die Beziehung der umgekehrten Proportionalität zwischen Enzymmenge und Zeiten gleichen Umsatzes ist nur angenähert vorhanden, und auch das nur in dem eng umgrenzten Bereich von 1 : 10 Teilen Tannase bei einer Reaktionsdauer unter 120 Stunden und einer Spaltung von 30—70 %. Nur bei kürzerer Einwirkung können Spaltungen unter 30 % einbezogen werden."

„Da also keine strenge Proportionalität vorliegt, oder mit anderen Worten, das Produkt aus Enzymmenge und Zeiten gleichen Umsatzes nicht genügend gleich bleibt, muss die Zeit als Variable ausgeschaltet werden." Dies tut Freudenberg durch die Aufstellung einer „24-Stunden-Kurve". Der Umsatz, den verschiedene Mengen ein- und desselben Tannasepräparates in 24 Stunden bewirken, wird auf die Ordinate aufgetragen, die Menge auf die Abszisse.

Tannasemenge		0,01	0,014	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,10
Präp. I	Abbau %	20,5	27,3	34,9	46,2	53,4	59,5	64,7	69,0	72,7	80,0
Präp. II		10,3			25,2	31,5	35,8				58,5

Soll Präparat II mit I verglichen werden, so braucht nur der Umsatz einer beliebigen Menge von II bei 33° in 24 Stunden festgestellt und auf der Kurve I aufgesucht zu werden. Alsdann kann man unmittelbar ablesen, welche Menge des Präparates I der angewandten von II entspricht.

Methode zur Bestimmung der Tannase[1]).

Fischer hat den Verlauf der Tannase-Spaltung der 1-Galloyl-Glukose polarimetrisch verfolgt, dann hat Freudenberg die Spaltung des Hamameli-Tannins und der Digalloylglukose aus Chebulinsäure studiert. Diese Stoffe sind schwer zugänglich und schwer löslich. Auch entstehen theoretische Schwierigkeiten bei diesen Gerbstoffen dadurch, dass der Abbau über Monogalloylhexosen von unbekannten Drehungswerten hinwegführt. Zunächst den genannten Gerbstoffen kommen die Galläpfeltannine in Frage. Sie sind zwar zugänglich und löslich, aber die Lösungen trüben und färben sich oft beim Abbau, ausserdem sind sie amorph und weisen kein gleichmässiges Drehungsvermögen auf.

Eine bessere Handhabe fand Freudenberg im Anstieg des Säuretiters; er hebt aber hervor, dass dieses Verfahren den Nachteil hat, dass weder bei der günstigsten noch überhaupt bei gleichbleibender Wasserstoffionenkonzentration gearbeitet werden konnte.

1) Qualitativ lässt sich die Hydrolyse der Tannine durch Vermischen mit 1% iger Gelatinelösung verfolgen.

Vielleicht lässt sich diese offenbar zweckmässige Methode in der Weise anwenden, in welcher v. Knaffl-Lenz im hiesigen Laboratorium die enzymatische Spaltung von Estern wie Aethyl Butyrat u. a. verfolgt hat, indem aus Mikrobüretten in kurzen Abständen so viel Alkali zugesetzt wird, dass die mit einem geeigneten Indikator, dessen Umschlagspunkt dem optimalen pH entspricht, versehene Lösung ständig auf dem Umschlagspunkt des Indikators gehalten wird.

Bestimmung der Wirksamkeit der Tannase; Spaltwert.

Freudenberg definiert den Spaltwert eines Tannasepräparates durch die Anzahl Milligramme, die nötig sind, um bei 33° in 24 Stunden 1,082 g wasserfreien Gallussäuremethylesters (entsprechend 1,000 g Gallussäure), in 200 ccm Wasser gelöst, zur Hälfte zu spalten. Die Präparate, deren Wirkung in der Figur 44 dargestellt ist, haben die Spaltwerte 35,4 und 86.

„Zur Bestimmung des Spaltwertes an einem Präparate unbekannter Stärke wird eine Probe von 50 ccm in der vorgeschriebenen Weise angesetzt (zwei Titrationen). Liegt die gefundene Spaltung zwischen 20 und 65%, so lässt sich der Spaltwert aus der Kurve I (Fig. 44) ablesen. Liegt das erste Spaltergebnis ausserhalb des angegebenen Bereichs, so ist der Versuch mit entsprechend veränderter Tannasemenge zu wiederholen. Die Bestimmung wird in den meisten Fällen genau genug sein. Es gelingt jedoch leicht, den zweiten Versuch in die Nähe von 50% Spaltung zu führen und alsdann einen dritten so anzusetzen, dass er hart an 50% trifft, und mit dem zweiten Versuche den Wert 50 einrahmt. Dann ist der Spaltwert unabhängig von der Kurve I ermittelt.“

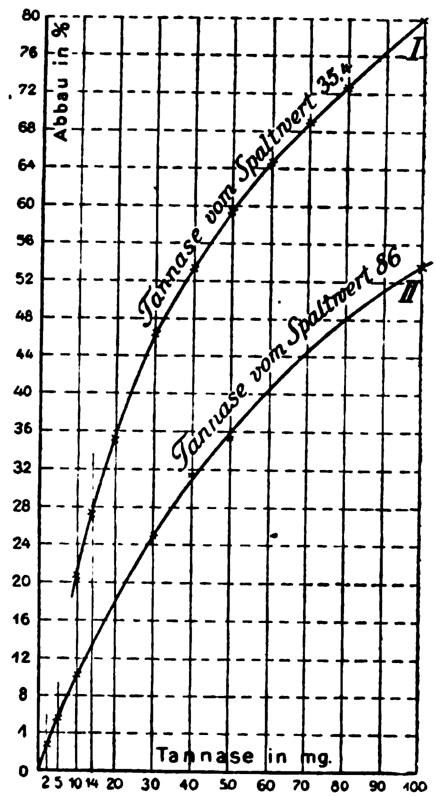


Fig. 44.

Technische Anwendungen der enzymatischen Gerbstoffspaltung.

Zur Darstellung von Gallussäure hat Calmette[1]) ein Verfahren beschrieben, nach welchem man Tannin-haltige Lösungen (Galläpfelextrakte) mit einer Aspergillusrasse „Aspergillus gallomyces“ impft und steril so lüftet, dass der Pilz innerhalb der Flüssigkeit wächst. Wie schon van Tieghem

[1]) Calmette, D.R.P. Kl. 12q. 129164; 1902.

gefunden hatte, ist Aspergillus enzymatisch gegenüber Tannin viel wirksamer, wenn sich das Mycel nicht auf der Oberfläche der Nährlösung, sondern im Innern derselben entwickelt hat.

Nach Ullmann[1]) werden zur Fabrikation von Gallussäure 100 kg grob zerquetschte Gallen in auszementierten Gruben mit 10 Liter Wasser angefeuchtet, in dem man 1 kg gewöhnliche Bäckerhefe aufgeschlämmt hat. Nach kurzer Zeit tritt Gärung ein; die Gärtemperatur soll 38° nicht überschreiten. Aus dem vergorenen Brei wird die Gallussäure mit Äther-Alkohol ausgeschüttelt.

---

[1]) Ullmann, Enzykl. d. techn. Chem. 5, 617; 1917.

CHEMIE DER ENZYME

VON

HANS v. EULER

II. TEIL:

SPEZIELLE CHEMIE DER ENZYME

2. ABSCHNITT:

DIE HYDROLYSIERENDEN ENZYME DER NUCLEINSÄUREN, AMIDE, PEPTIDE UND PROTEINE

BEARBEITET VON

HANS v. EULER UND KARL MYRBÄCK

MIT 47 TEXTFIGUREN

AUTOREN-VERZEICHNIS ZUM 1. UND 2. ABSCHNITT

ZWEITE UND DRITTE, NACH SCHWEDISCHEN VORLESUNGEN VOLLSTÄNDIG UMGEARBEITETE AUFLAGE

MÜNCHEN · VERLAG VON J. F. BERGMANN · 1927

Inhalt des 2. Abschnittes.

Die eigentlichen Proteasen. Bearbeitet von Karl Myrbäck.

2. Abschnitt.

Die hydrolysierenden Enzyme der Nucleinsäuren, Amide, Peptide und Proteine.

Einteilung.

Stellt man die chemische Gleichung der katalysierten Reaktionen in den Vordergrund der Betrachtung, so wird man in diesem Abschnitt alle Enzyme zusammenfassen, welche die Bindung zwischen Kohlenstoff und Stickstoff lösen oder vermitteln, ganz besonders alle auf die Carbamin-Gruppierung

$$R \cdot CO—NH \cdot R'$$

eingestellten Enzyme, welche man demgemäss Carbamasen (oder — da sie die typische Peptidbindung lösen — Peptidasen) nennen kann. Wenn wir nun auch wissen, dass die Hydrolyse dieser Peptidbindung bei der Proteolyse eine dominierende — keineswegs die einzige — Rolle spielt, so sind wir doch über die Einzelvorgänge der Eiweissspaltung noch ungenügend unterrichtet und deshalb nicht imstande, die hierher gehörenden Enzyme vom chemischen Gesichtspunkt aus zu differenzieren. Wir müssen also einstweilen noch die Einteilung vom biologischen Standpunkt aus vornehmen, und die enzymatischen Stoffgemische verschiedener Herkunft einzeln beschreiben; soweit möglich werden dabei die Zusammenhänge zwischen gleichgearteten Wirkungen von Enzymen ungleicher Abstammung hervorgehoben.

Die wichtigsten Enzyme, welche in diesem Abschnitt zu behandeln sind, werden oft als Pepsin, Trypsin und Erepsin zusammengefasst. Dem Fachmann ist dabei bereits klar, dass man damit nicht mehr einzelne Enzyme meint, sondern Enzymgruppen gewisser Organe zusammenfasst, wie überhaupt Namen mit der Endsilbe -in zweckmässig als Bezeichnungen für natürliche Enzymgruppen — z. B. Emulsin — gebraucht werden.

Bevor wir auf die Hauptgruppe der Proteasen eingehen, also auf diejenigen, welche die Gruppe CO—NH angreifen, haben wir im Anschluss an die im vorhergehenden Band behandelten Glucosidasen die Nucleosidasen nochmals zu besprechen; dies geschieht am besten im Zusammenhang mit den übrigen Enzymen der Nucleinspaltung, die man als Nucleasen zusammenfassen kann.

Darauf behandeln wir die Gruppe der Amid-spaltenden Enzyme oder Amidasen, unter denen die Urease am besten bekannt ist.

Die Enzyme vom Typus des Pepsins, Trypsins und Erepsins, welche am Abbau der eigentlichen Proteine beteiligt sind, werden in tierische und pflanzliche Enzyme und nach Organen geschieden; weitere Einteilungsprinzipien bieten die Substrate und bis zu einem gewissen Grade auch der Aciditätsgrad, bei welchem die einzelnen Enzyme ihre optimale Wirkung entfalten.

13. Kapitel.

Die hydrolysierenden Enzyme der Nucleinsäuren und ihrer Spaltprodukte.

A. Einleitung.

Nucleoproteide und die phosphorreicheren Nucleine werden in Eiweiss und Nucleinsäuren gespalten; über die bei diesen Reaktionen eventuell beteiligten spezifischen Enzyme ist noch wenig bekannt.

Typische Repräsentanten der Nucleinsäuren sind bekanntlich nunmehr als Verbindungen je eines Moleküls Phosphorsäure, einer Monose und einer Pyrimidin- oder Purinbase erkannt. Levene, dem man in erster Linie diese Einsicht verdankt, bezeichnet diese einfachen Stoffe als Nucleotide und die darauf eingestellten Enzyme als Nucleotidasen, während Nucleoside dem gleichen Forscher zufolge die entsprechenden phosphorsäurefreien Verbindungen darstellen, welche also nur noch die Monose und die Base enthalten.

Zur Klärung der Nomenklatur mag folgendes Schema dienen:

Substrat	Enzym	Reaktionsprodukt
Nucleoproteide	(Nucleoproteidasen)	Nucleine
Nucleine	(Nucleinasen)	Eiweiss + Nucleinsäuren
Poly-Nucleinsäuren (Poly-Nucleotide)	Poly-Nucleotidasen[1]	Nucleotide
Nucleotide	Nucleotidasen	Nucleoside + Phosphorsäure
Nucleoside	Nucleosidasen	Monose + Base

Aus dem S. 3 über die Nucleoproteide und Nucleine Gesagten geht hervor, dass die Existenz besonderer Spaltungs-Enzyme für Nucleoproteide und Nucleine (Nucleoproteidasen und Nucleinasen) wenig wahrscheinlich ist.

B. Spaltung der Nucleoproteide und Nucleine.

Nucleoproteide und Nucleine spielen bekanntlich in den Zellkernen eine dominierende Rolle; viele Kerne (z. B. der Eiterzellen und der Spermatozoen [Miescher[2]]) bestehen zum grössten Teil aus diesen Stoffen.

---

[1] Levene nennt diese Enzyme Nucleinasen. Levene und Medigreceanu, Jl Biol. Chem. 9, 65 und 389; 1911.

[2] Miescher, Ges. Abh. Bd. 2; 1897.

Substrate.

Als Nucleoproteide bezeichnet man zusammengesetzte, native Proteine, welche durch die beiden Bestandteile, Nucleinsäuren und Eiweiss, charakterisiert sind. Sie enthalten demgemäss Phosphor (meist 0,5—2%), in manchen Präparaten wurde ein Gehalt von Eisen gefunden[1]. Nucleoproteide sind Säuren, die sich in Wasser wenig oder nicht, in Alkalien unter Salzbildung lösen und durch Essigsäure wieder gefällt werden[2]. Die Eiweisskomponente, über die noch wenig bekannt ist, wurde in einzelnen Fällen als Histon erkannt.

Je nachdem Nucleoproteide durch kalte oder heisse Lösungsmittel aus den Organen extrahiert worden sind, unterscheidet man

α-Nucleoproteide und
β-Nucleoproteide.

Die neutralen Lösungen der Alkali-Nucleoproteide erfahren durch Erhitzen eine Spaltung. Dabei wird unter Gerinnung einer abgetrennten Eiweisskomponente der nucleinsäurehaltige Rest freigemacht; für denselben ist eine besondere Bezeichnung eingeführt worden, nämlich

Nuclein oder „echtes Nuclein“. Aus der eben erwähnten Entstehungsweise geht hervor, dass die Nucleine phosphorreicher sein müssen als die natürlichen Ausgangsprodukte; Hammarsten[1] gibt einen Gehalt von mindestens 5% P an. Im übrigen sind die Nucleine gegen die Nucleoproteide nicht scharf abgegrenzt, da auch die Nucleine noch abtrennbares Eiweiss enthalten.

Alkali spaltet aus Nucleoproteiden und Nucleinen anorganisches Phosphat ab, aber nicht so leicht, wie aus Nucleoalbuminen [Unterscheidung durch 1%ige Natronlauge nach Plimmer und Scott[3]].

Zur Darstellung der Nucleine empfiehlt Hammarsten die Hauptmasse des Eiweisses im Ausgangsmaterial durch Pepsinsalzsäure zu zerlegen, den Rückstand mit verdünnter NH_3 auszulaugen, mit Salzsäure zu fällen und durch Umfällen zu reinigen.

Auch den Nucleinen werden saure Eigenschaften zugeschrieben; sie sind in Alkohol ganz unlöslich, in Wasser sehr wenig, in Alkalien mehr oder weniger leicht löslich. Bemerkenswert ist die Salzbildung mit basischen Farbstoffen.

Die Nucleine sind Denaturationsprodukte und können wohl im allgemeinen als salzartige Verbindungen von Nucleinsäuren mit basischen Eiweisskörpern aufgefasst werden.

[1] Siehe O. Hammarsten, Lehrbuch, 9. Aufl., S. 132. — Siehe auch O. Hammarsten, H. 19, 19; 1894. Kein Eisen findet Sauerland, H. 64, 16; 1909.

[2] Untersucht sind besonders eingehend die Nucleoproteide des Pankreas, der Leber (Wohlgemuth, H. 37, 42 u. 44), des Gehirns (A. Levene), der Spermatozoen (Kossel) und Bakterien (Toeniessen, Zbt. Bakt. I, 85, 379; 1921). — Zur Literatur siehe ferner Burian, Erg. d. Physiol. 5, 768; 1906.

[3] Plimmer und Scott, Jl Chem. Soc. 93 und 94, 1699; 1908.

Ob in den Nucleoproteiden eine eigentliche Bindung an das abspaltbare Eiweiss vorkommt, oder ob dieses immer nur durch seine basischen Gruppen mit den Nucleinsäuren salzartige Verbindungen eingeht, eine Auffassung, die Steudel[1] vielfach mit Erfolg vertritt, und die sich auch sonst bestätigt[2], ist noch nicht endgültig entschieden.

Einwirkung enzymhaltiger Säfte.

Sind die Nucleoproteide wirklich Salze von Nucleinsäuren im oben erwähnten Sinne, so könnte man die Tatsache, dass der Magensaft Nucleine aus Nucleoproteiden entstehen lässt ohne weiteres auf die Einwirkung der Salzsäure zurückführen und bräuchte nicht die Wirkung des Pepsins bzw. eines besonderen Bestandteiles, einer Nucleoproteidase, anzunehmen.

Das gleiche gilt hinsichtilch der Wirkung des Magensaftes auf Nucleine. Auch aus diesen wird durch den Magensaft zuweilen Eiweiss abgespalten; welchen Anteil daran die Salzsäure und welchen Anteil Enzyme haben, liess sich aus den Angaben der älteren Literatur nicht entnehmen. Eine Mitteilung von Nakagawa aus dem Steudelschen Laboratorium bahnt eine Klärung der Verhältnisse an.

Nakagawa[3] hat ein Präparat aus Heringssperma, welches nach der gegenwärtigen Nomenklatur als Nucleoproteid zu bezeichnen ist und ein daraus dargestelltes „Nuclein" auf ihr Verhalten zu Pepsinpräparaten geprüft. Seiner Mitteilung entnehmen wir folgendes:

Von einem Pepsinpräparat wurden 0,2 g in 500 ccm etwa 0,2 % Salzsäure aufgelöst. Zu je 100 ccm der wasserklaren Lösung wurde je 1 g der zu untersuchenden Substanz zugesetzt. Es wurden so der Pepsinverdauung unterworfen:

1. ein aus Köpfen von Heringsspermien dargestelltes neutrales nucleinsaures Protamin, wie auch
2. ein nach Miescher durch Essigsäure-Fällung hergestelltes Produkt, welches als Nucleoproteid angesehen werden kann.

Die einzelnen Ansätze wurden bei 37° aufbewahrt und vor der Ablesung klar filtriert. Dann zeigten im 2 dm-Rohr die Ansätze folgende Drehung:

	nach Tagen			
	1	2	3	4
Pepsinsalzsäure	0	0	0	0
Salzsäure + reine Köpfe	— 0,20	— 0,24	— 0,26	— 0,26
Pepsinsalzsäure + reine Köpfe	— 0,24	— 0,28	— 0,32	— 0,36
Salzsäure + Essigsäurefällung	— 0,21	— 0,24	— 0,26	—
Pepsinsalzsäure + Essigsäurefällung	— 0,49	— 0,58	— 0,60	— 0,62

Die Pepsinsalzsäure hatte also sowohl bei den reinen Köpfen wie besonders bei der Essigsäurefällung eine Zunahme des Drehungsvermögens bewirkt; ferner genügte ein kurzer Aufenthalt im Brutschrank, um merkliche Mengen der untersuchten Körper zu lösen; nach einigen Tagen war fast alles gelöst.

[1] Steudel, H. 90, 300; 1914. — 122, 298; 1922.
[2] E. Hammarsten, Privatmitteilung.
[3] Nakagawa, H. 124, 274; 1923.

Da das Protamin gegen Pepsinsalzsäure beständig ist, so bleibt als angreifbare Komponente die Nucleinsäure übrig. Dieselbe ist bekanntlich gegen Mineralsäuren äusserst unbeständig, spaltet sehr leicht Alloxurbasen ab und geht in Thyminsäure und andere leicht lösliche Produkte über. „An den reinen Köpfen kann man sich von der leichten Abspaltbarkeit der Alloxurbasen rasch durch Anstellung der Diazoreaktion überzeugen" — das Protaminsulfat, allein mit Pepsinsalzsäure behandelt, gab keinen positiven Ausfall der Diazoreaktion.

Mit ammoniakalischer Silberlösung gaben einen deutlichen Niederschlag nach der Behandlung mit Pepsinsalzsäure:

1. thymonucleinsaures Natrium,
2. Nucleohiston nach Lilienfeld.

Histon allein gab unter den gleichen Bedingungen keinen Niederschlag.

Nakagawa zieht aus seinen Versuchen den Schluss, dass „die bisher benutzte Methode, durch Pepsinverdauung eines Nucleoproteides zu einem Nuclein zu kommen, nicht brauchbar ist".

Es lässt sich also kein unzersetztes „Nuclein" gewinnen, und es ist fraglich, ob die älteren Beobachter überhaupt „Nuclein", d. h. Körper mit unzersetzter Nucleinsäure in Händen gehabt haben. Bei den früheren unvollkommenen Kenntnissen über die Zusammensetzung der Nucleinsäuren hat man die Einwirkung der Pepsinsalzsäure meist durch Bestimmung des Phosphorsäuregehaltes der unlöslichen Körper verfolgt. „Es leuchtet aber ein, dass man phosphorreichere Körper aus den Nucleoproteiden nicht nur erhalten kann durch Abspaltung locker gebundener Eiweisskörper, wie die älteren Forscher annahmen, sondern dass die Produkte auch phosphorreicher werden können dadurch, dass die Nucleinsäure unter Abspaltung der Nucleinbasen zerlegt wird."

C. Der enzymatische Abbau der Nucleinsäuren (Nucleotide).

1. Substrate (vgl. auch 1. Abschnitt, S. 59 u. ff.).

Die Nucleinsäuren enthalten drei typische Komponenten: Purin- oder Pyrimidinbasen, Zucker und Phosphorsäure. Bei der Einteilung der Nucleinsäuren kann man nach verschiedenen Grundsätzen verfahren. Kossel[1] legt die Natur der Basen zugrunde, von Levene[2] stammt die Einteilung in einfache Nucleinsäuren oder Mononucleotide und zusammengesetzte Nucleinsäuren oder Polynucleotide, und Feulgen[3] hebt neuerdings hervor, dass die Zuckergruppe das wesentlichste Kennzeichen der Nukleinsäuren ausmacht. In Anlehnung an Levene und Feulgen stellen wir folgende Einteilung voran:

A. Einfache Nucleinsäuren, Mononucleotide,
Pentoside,
Hexoside.

[1] Kossel, Chemische Zusammensetzung der Zelle. Arch. (Anat. u.) Physiol. 181; 1891.

[2] Levene und Medigreceanu, Jl Biol. Chem. 9, 65 u. 389; 1911.

[3] Feulgen, H. 123, 197; 1922. — Eine Übersicht über die Chemie der Nucleinsäuren geben Steudel, Thannhauser und Winterstein im Handb. d. Bioch. Arbeitsmeth. 2. Aufl., Abt. I, Tl. 8, Heft 1; 1920.

B. Polynucleotide
   1. Pentosenhaltige Polynucleotide
      Hefennucleinsäure (Triticonucleinsäure),
   2. Hexosenhaltige Polynucleotide (mit echter Aldehydreaktion).
C. Gekoppelte Nucleinsäuren.

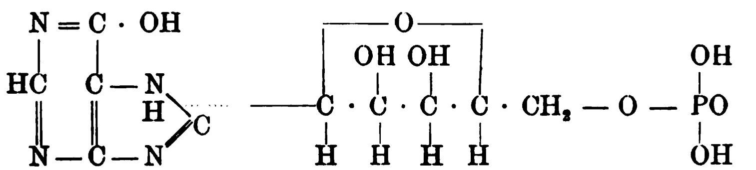
I. Mononucleotide.

Pentoside.

In dieser Gruppe sind Inosinsäure und Guanylsäure zuerst genau beschrieben worden.

In beiden Nucleotiden ist nach Levene und Jacobs[1] die Pentose die gleiche, nämlich d-Ribose; beide enthalten ferner Purinbasen.

Die im Fleischextrakt aufgefundene Inosinsäure ist als Phosphorsäure-Ribose-Hypoxanthin erkannt. Ihre Zusammensetzung wird durch die Formel dargestellt:

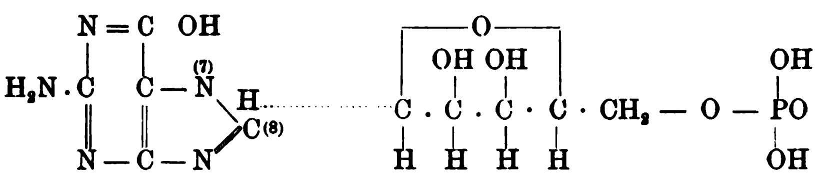


Hypoxanthin Ribose

Durch Abspaltung der Phosphorsäure aus der Inosinsäure entsteht das Inosin, ein Hypoxanthinpentosid. Bezüglich der Bindungsstellen besteht noch insofern eine Unsicherheit, als zwischen den Ringatomen 7 und 8 noch zu entscheiden ist[2].

Levene hat für Stoffe vom Typus des Inosins den Namen Nucleoside vorgeschlagen (vgl. S. 329).

Analog ist die Konstitution der Guanylsäure, welche aus dem Rinder-Pankreas (Bang), Milz[3] (Jones) oder Leber[4] gewonnen wird, und von Levene aus Hefenucleinsäure in Krystallen ($+ 2 H_2O$, Schmelzpunkt 180°) erhalten wurde (Jl Biol. Chem. 40).



Guanin d-Ribose

[1] Levene und Jacobs, Chem. Ber. 42, 2102, 2469, 2474, 3247; 1909. — 43, 3147; 1910. — 44, 746; 1911. — Neuberg hält die Pentose der Inosinsäure für l-Xylose (Chem. Ber. 43, 3501; 1910).

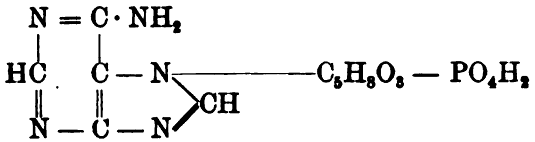
[2] Vgl. Hans Fischer, H. 60, 69; 1909.

[3] Jones und Rowntree, Jl Biol. Chem. 4, 289; 1908.

[4] Levene und Mandel, Biochem. Zs 10, 221; 1908.

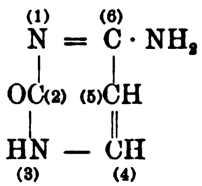
Die Guanylsäure hat also (wie die Inosinsäure) sauren Charakter; sie löst sich in Natronlauge leicht auf. Durch Mineralsäuren wird aus einer solchen Lösung die Säure freigemacht, welche in Wasser löslich ist; durch Essigsäurezusatz entsteht hingegen unter Gelatinieren der gesamten Flüssigkeit das saure Alkalisalz (Feulgen, H. 106). Vgl. zur Kenntnis der Guanylsäure auch W. Jones, Jl Biol. Chem. 12, 31; 1912. — Levene, Jl Biol. Chem. 40, 415; 1919.

Ausserdem sind (aus Hefennucleinsäure) isoliert worden:



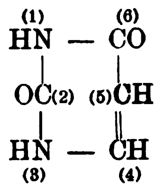
Adenosinphosphorsäure = d-Ribose-Adenin-Phosphorsäure,

ferner die Verbindungen der d-Ribose-Phosphorsäure mit den Pyrimidinbasen:



Cytosin
Bindung an (3) oder (5)

und



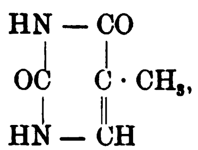
Uracil
Bindung an (1) oder (5)

Daraus entstehen:

Cytidinphosphorsäure[1] und Uridinphosphorsäure[1].

Endlich ist die entsprechende Verbindung

des Thymins:



die d-Ribose-Thymin-Phosphorsäure in einem Polynucleotid der Thymusdrüse enthalten.

Hexoside.

Thymin ist auch in Hexosiden gefunden; eine Thymin-Hexose-Phosphorsäure entsteht nämlich aus Thymusnucleinsäure [bzw. aus der entsprechenden Diphosphorsäure[2]] durch Hydrolyse mit Pikrinsäure.

Thannhauser und Ottenstein[3] haben auch eine entsprechende Cytosin-Hexose-Phosphorsäure dargestellt, und zwar ebenfalls aus der Thymusdrüse.

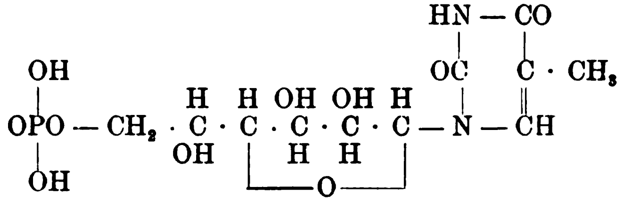
---

[1] Siehe Thannhauser und Dorfmüller, H. 100, 121; 1917 und 104, 65; 1919. — Levene, Jl Biol. Chem. 33, 425; 1918 und 40, 395; 1919.

[2] Levene und Mandel, Chem. Ber. 41, 1905; 1908.

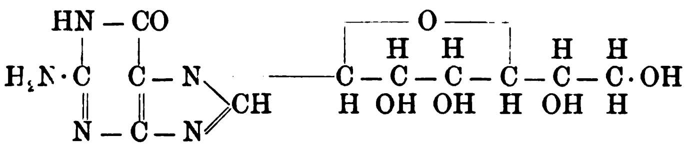
[3] Thannhauser und Ottenstein, H. 114, 39; 1921.

Die Struktur des in den tierischen Nucleotiden vorgebildeten Zuckers ist noch ungeklärt.



Thyminhexosephosphorsäure.

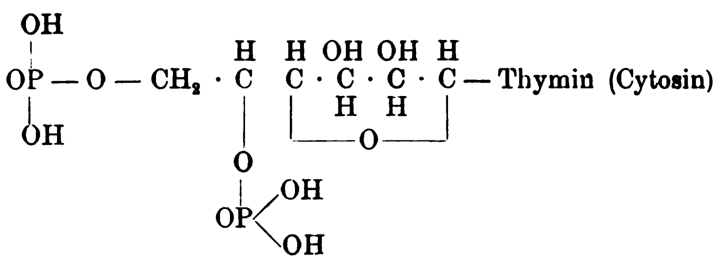
Bereits 1912 haben P. A. Levene und Jacobs (Jl Biol. Chem. 12) aus Thymusnucleinsäure eine Guaninhexosephosphorsäure darzustellen versucht. Durch Einwirkung eines Enzyms auf Thymusnucleinsäure sind sie schliesslich zu einem Guanosinhexosid gelangt.



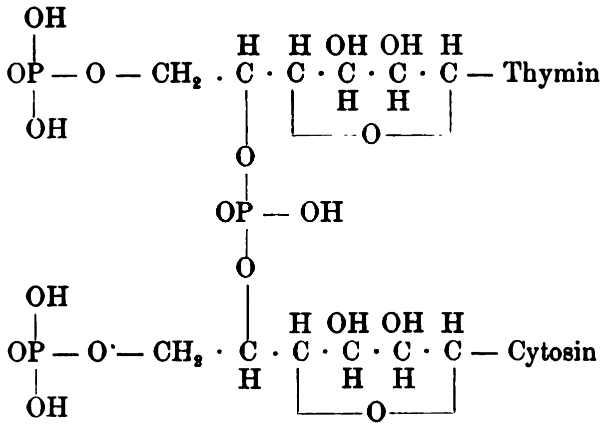
Guanin-Hexosid.

Levene und Jacobs machen nach Einwirkung des nicht näher bezeichneten Enzyms die Lösung der Thymusnucleinsäure ammoniakalisch und setzen solange starken Alkohol zu, bis ein Niederschlag entsteht. Nach Filtration wird die Lösung im Vakuum eingedunstet, der Rückstand wird gelöst und die Operation wiederholt. Schliesslich werden die Nucleotide mit Bleiacetat gefällt und dann mit H_2S entbleit.

Diphosphorsäuren. Levene und Jacobs haben Thymin- und Cytosindiphosphorsäure durch Hydrolyse der Thymusnucleinsäure mit 2%iger Schwefelsäure dargestellt und als Brucinsalze isoliert.



Hierzu bemerkt Thannhauser: „Es dürfte nicht wahrscheinlich sein, dass die . . . . Diphosphorsäuren im grossen Thymusnucleinsäuremolekül jedes für sich als Mononucleotid vorgebildet ist. Es erscheint vielmehr möglich, dass die Cytosin- und Thyminhexosemonophosphorsäuren durch eine Phosphorsäurebrücke zusammengehalten werden. Bei der Hydrolyse würde dieser doppelseitig verankerte Phosphorsäureester einmal an der Cytosinhexosephosphorsäure, einmal an der Thyminhexosephosphorsäure haften bleiben und so die gleichzeitige Entstehung von Pyrimidinhexosemono- und Diphosphorsäure bei der pikrinsauren Hydrolyse erklären" (l. c. S. 44).

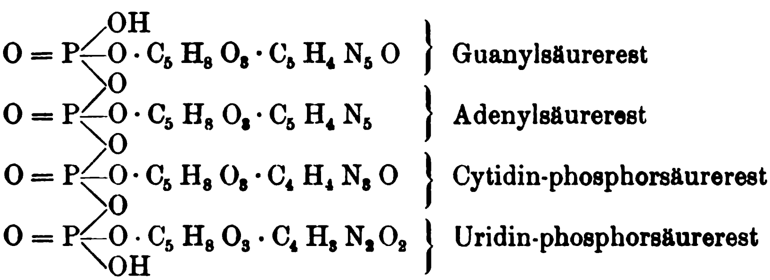


II. Polynucleotide.

1. Pentosenhaltige Polynucleotide.

Die Forschungen von Levene, Jones, Thannhauser, Feulgen u. a. haben zunächst die einfachen Komponenten der Nucleinsäuren, die Mononucleotide, kennen gelehrt und dann gezeigt, dass dieselben zu Di-, Tri- und Tetranucleotiden verbunden sind. Am eingehendsten untersucht ist bisher die Hefenukleinsäure.

Man nahm zunächst mit Levene[1] an, dass der Aufbau der Polynucleotide aus Mononucleotiden durch die Phosphorsäure vermittelt wird.



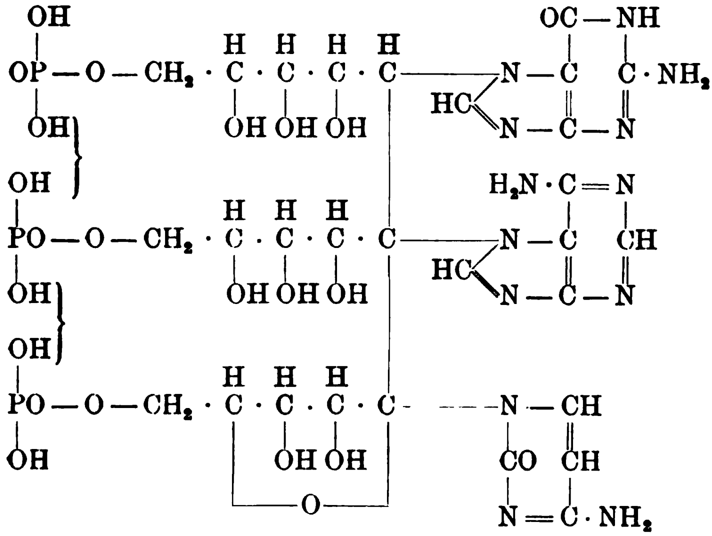
Später erwogen Jones[2] und Levene (Jl Biol. Chem. 33, 229 u. 425; 1918) die Möglichkeit, dass Tetra-Ribose den Kern diese Nucleinsäure bildet, nach dem Schema

Phosph. — Ribose — Guanin
|
Phosph. — Ribose — Adenin
|
Phosph. — Ribose — Cytosin
|
Phosph. — Ribose — Uracil

[1] Levene, Biochem. Zs 17. — Jl Biol. Chem. 31, 591; 1917. — Levene und Jacobs, Jl Biol. Chem. 12, 411; 1912. — Chem. Ber. 44, 740; 1911.

[2] Jones und Read, Jl Biol. Chem. 29, 123 und 31, 39; 1917.

1917 ist es Thannhauser aber gelungen, die Hefenucleinsäure in Uridinphosphorsäure (Phosphorsäure — Kohlehydrat — Uracil) und folgendes Trinucleotid zu spalten[1].



Thannhauser und Dorfmüller[2] stellten daher für die Hefenucleinsäure eine Formel auf, in der die Uridinphosphorsäure nur durch eine Phosphorsäurebindung fixiert ist, während der Rest, den Thannhauser als Triphosphornucleinsäure bezeichnet, noch durch eine intramolekulare Bindung zusammengehalten wird. Er gelangte mit Dorfmüller durch die Hydrolyse mit Pikrinsäure zu den beiden krystallisierten Spaltprodukten:

1. dem Dinucleotid Guanosin-Adenosinphosphorsäure[3] und
2. Cytidinphosphorsäure.

Aus dem erstgenannten Dinucleotid konnte dann auch bald darauf die Adenosinphosphorsäure isoliert werden[4].

Hefenucleinsäure ist sehr alkaliempfindlich und spaltet mit verdünnter Natronlauge äusserst leicht Guanylsäure ab, bezw. zerfällt in die einzelnen einfachen Nucleinsäuren[5]; dieser Umstand dürfte für die Konstitutionsbestimmung wichtig sein. Thymusnucleinsäure wird dagegen von Alkalien bei Zimmertemperatur nicht angegriffen[6].

Polynucleotidasen.

Falls sich die nunmehr naheliegende Auffassung bestätigt, dass in einer Gruppe von Polynucleotiden die Bindung der Mononucleotide durch die

[1] Thannhauser und Dorfmüller, H. 100, 121; 1917. — Siehe hierzu auch Levene, Jl Biol. Chem. 43, 379; 1920.
[2] Thannhauser und Dorfmüller, Chem. Ber. 51, 467; 1918.
[3] Thannhauser und Dorfmüller, H. 104, 65; 1919.
[4] Thannhauser, H. 107, 157; 1919.
[5] Siehe hierzu Steudel und Peiser, H. 120, 292; 1922.
[6] Steudel und Nakawa, H. 128, 129; 1923.

Phosphorsäure erfolgt, so wären die diese Bindung lösenden Enzyme den Esterasen anzureihen. Dagegen dürfte die Aufspaltung einer zwischen den Kohlehydratresten statthabenden Verkettung durch Glucosidase-ähnliche Enzyme geschehen. Man wird deshalb die Existenz mindestens zweier verschiedener Polynucleotidasen (Nucleinasen nach Levene) vermuten.

2. Hexosenhaltige Polynucleotide; Thymusnucleinsäure.

Die Natur der Hexosen, welche in diese Gruppe eingehen und die Anzahl der Hexosenreste ist noch nicht näher bekannt; der Menge der gebildeten Lävulinsäure zufolge kann man vier solche Reste annehmen. Feulgen[1] nimmt an, dass das Kohlehydrat dem von Fischer beschriebenen Glucal[2] nahe steht. Pentosen scheinen in der Thymonucleinsäure nicht vorzukommen.

Charakteristisch für die Thymonucleinsäure bzw. für die Hexosenhaltigen Polynucleotide soll nach Feulgen die Reaktion mit fuchsinschwefliger Säure und die Fichtenspanreaktion sein.

III. Gekoppelte Nucleinsäuren.

„Gekoppelte“ oder zusammengesetzte Nucleinsäuren haben gleichzeitig und unabhängig von einander Feulgen[3] und Einar Hammarsten[4] beschrieben, und zwar ist am besten untersucht die Guanylnucleinsäure von der Pankreasdrüse des Rindes[5].

Die Charakterisierung der hierhergehörenden Stoffe ist noch nicht ganz fest, was neuerdings besonders Levene[6] hervorhebt. Auch über die Bindungsart der Komponenten stehen noch entscheidende Versuche aus, und demgemäss ist es fraglich, ob spezifische Enzyme existieren, welche die „gekoppelten“ Nucleinsäuren in die Polynucleotide der bekannten Typen auflösen. — Chemie und biologische Bedeutung der Nucleinsäure-Verbindungen behandelt in einer sehr bemerkenswerten Arbeit Einar Hammarsten (Biochem. Zs 144, 383; 1924).

2. Vorkommen der Nucleotidasen.

Der Nachweis von nucleotidspaltenden Enzymen (sie werden von Jones „Phosphonucleasen“ genannt) ist oft in methodisch unzulänglicher Weise geführt worden, indem die Zunahme von anorganischem Phosphat oder einer Purin- bezw. Pyrimidinbase der Entscheidung zugrunde gelegt wurde. In dieser Hinsicht bleibt viel nachzuholen, besonders was die Trennung und Isolierung der einzelnen Enzyme betrifft.

[1] Feulgen, H. 92, 154; 1914. — 100, 241; 1917.
[2] E. Fischer, Chem. Ber. 47, 196; 1914.
[3] Feulgen, H. 108, 147; 1919. — 123, 145; 1922.
[4] Einar Hammarsten, H. 109, 141; 1920. — Hammarsten und Jorpes, H. 118, 224; 1921.
[5] Siehe hierzu auch Steudel und Nakagawa, H. 126, 250; 1923.
[6] Levene, Jl Biol. Chem. 48, 177; 1921.

Wichtig ist in erster Linie der von Nakayama[1] geführte Nachweis, dass reines Erepsin Nucleinsäuren gegenüber wirkungslos ist. Das gleiche gilt nach den Arbeiten von Schittenhelm[2] und Sachs für reines Trypsin.

Nucleotidasen machen sich in erster Linie bei der Autolyse von Zellen und Geweben geltend und ihre Mitwirkung bei der Autolyse ist auch zeitig gefunden worden (Araki[3], Reh[4], 1903).

a) Tierische Enzyme. Sachs[5] verdankt man die ersten eingehenderen Versuche über selbständige, zur Gruppe der „Nucleasen" gehörige Enzyme. Ein sehr geeignetes Material zur Darstellung von Nucleotidasen ist Pankreas. Von anderen Organen sind zu nennen:

Magensaft ist ganz unwirksam. Darmsaft von Fistelhunden[6] spaltet aus Nucleinsäuren Phosphorsäure und (in geringem Grad) Purinbasen ab, und zwar erfolgt die Spaltung hauptsächlich im unteren Jejunum und Ileum.

Thannhauser und Dorfmüller (H. 100, 121; 1917) betonen, dass im Darm vermutlich keine vollständige Aufspaltung des Nucleinsäurekomplexes stattfindet, sondern dass im Darm enzymatisch Mononucleotide gebildet werden, welche zur Resorption gelangen und erst im Kreislauf ihre Phosphorsäure verlieren. — Milz des Rindes nach A. Schittenhelm, H. 42, 251; 1904.

Leber[7], Thymus, Darm[1 8], Hoden[9] (Stier); ferner nach Juschtschenko[10] Nieren, Schilddrüse, Nebennieren, Hirn, Lunge und Herz. Muskeln von Säugetieren scheinen aber arm an Nucleotidasen zu sein (siehe Sachs, l. c.). — In der Haut: Wohlgemuth, Biochem. Zs 153, 487; 1924. — Organe von Fischen und Mollusken: Y. Okuda, Jl Coll. Agr. Tokyo 5; 1916.

Auch Jones fand bei seinen eingehenden Versuchen das Enzym in den meisten Organen[11]. — Carcinome sind von Goodman[12] untersucht worden.

Sehr reich an Nucleotidasen sind nach Tschernorutzky[13] die Leukocyten. Satta und Lattes[14] fanden Nucleinsäurespaltung durch kernhaltige Erythrocyten. — Pathologische Sera: Pincussen und Krause, Bioch. Zs 63.

b) Pflanzliche Enzyme. Bezüglich höherer Pflanzen liegen positive

[1] Nakayama, H. 41, 348; 1904.

[2] Schittenhelm und Schrötter, H. 39, 203; 1903. — 40, 62; 1904. — 41, 284; 1904. — Abderhalden und Schittenhelm, H. 47, 452; 1906. — Steudel, H. 55, 408; 1908.

[3] Araki, H. 38, 84; 1903.

[4] Reh, Hofm. Beitr. 3, 569; 1903.

[5] Fr. Sachs, H. 46, 337; 1906.

[6] London und Schittenhelm, H. 70, 10; 1910.

[7] Amberg und Jones, H. 73, 407; 1911.

[8] Carbone, Arch. di Fisiol. 4.

[9] Mihara, H. 75, 443; 1911.

[10] Juschtschenko, Bioch. Zs 31, 377; 1911. — H. 75, 141; 1911.

[11] Siehe Jones, Jl Biol. Chem. 9, 169; 1911 und 12, 31; 1912.

[12] Goodman, Jl exp. Med. 15, 477; 1912.

[13] Tschernorutzky, H. 80, 298; 1912 und Biochem. Zs 44, 353; 1912.

[14] Satta und Lattes, Giorn. R. Accad. Med. Torino 71, 88. Biochem. Zbt. 8, 1421.

Angaben nur von Tschernorutzky vor (l. c.), welcher Nucleinsäurespaltung durch Emulsinpräparate fand, und von A. Schittenhelm, der Lupinenkeimlinge mit Erfolg untersucht hat (H. 63, 289, 1909).

Algen und Farnkräuter sind nach Teodoresco[1] gegen Nukleinsäuren wirksam; in einem japanischen Hutpilz fand Kikkoji[2] eine Nukleotidase.

Unter den niederen Pilzen und Bakterien dürften die meisten fähig sein, aus Nukleinsäuren Phosphorsäure abzuspalten. Besondere Angaben findet man bei folgenden Autoren:

Hefe	Hahn u. Geret	Zs Biol. 40, 117.
Torula	von Herwerden	Folia Microbiol. I. 1918.
Schimmelpilze	L. Iwanoff	H. 39, 31; 1903.
„	Dox	U. S. Dep. Agr. Nr. 120; 1910.
Bakterien	Schittenhelm u. Schrötter	H. 39, 203; 1903. — 41, 4; 1903.
„	Thannhauser u. Dorfmüller	H. 102, 148; 1918.
„	Plenge	H. 39, 190; 1903.

3. Darstellung.

Man zerreibt gehackten Rinderpankreas mit feinem Sand und presst unter Zusatz von etwas Kieselgur einen Saft aus, der filtriert werden kann, ohne etwas von seiner enzymatischen Wirksamkeit zu verlieren. Er enthält natürlich sehr viele unwirksame Bestandteile und zahlreiche andere Enzyme, welche zum Teil auf die Reaktionsprodukte der Nucleotidasen einwirken, z. B. Desamidasen und Oxydasen[3]. Über die Ausfällung der Nucleotidasen aus Presssäften und Organextrakten und über die Reinigung von Nucleotidase-Präparaten ist noch wenig bekannt. Sachs (l. c. 348) hat Pankreaspresssaft mit Ammoniumsulfat gesättigt und die Fällung mit Alkohol und Äther getrocknet. In ähnlicher Weise hat L. Iwanoff Presssäfte aus Schimmelpilzen dargestellt.

A. Schittenhelm, dem man eingehende Studien über die Enzyme des Nucleinstoffwechsels verdankt, hat „Nucleasen“ aus Rindermilz und aus Rinderleber gewonnen (H. 42, 251; 1904). Er mischt das fein zerriebene Organ mit 1—2 Teilen Wasser, lässt mit Toluol mehrere Stunden stehen, koliert und filtriert.

4. Wirkungsbedingungen.

Verschiedene Substrate scheinen, wie auch zu erwarten ist, mit verschiedener Geschwindigkeit gespalten zu werden. Die vorhandenen Tatsachen reichen auch noch nicht aus, um den Vorschlag eines Standard-

[1] Teodoresco, C. r. 155, 300, 464, 554; 1912.
[2] Kikkoji, H. 51, 201; 1907.
[3] Siehe Neuberg, Biochem. Zs 30, 505; 1911. — Pighini, H. 70, 85; 1911.

substrates, etwa Guanylsäure oder Inosinsäure zu begründen. Jedenfalls wird man die Wirkung auf Pentosenucleotide und Hexose-Nucleotide genau zu unterscheiden haben.

Auch über die Aciditätsbedingungen liegen nur wenige Anhaltspunkte vor, welche darauf hindeuten, dass die Nucleotidspaltung bei der Autolyse tierischer Organe ihr Optimum etwa zwischen pH = 6 und 7 besitzt[1]. Die vorhandenen, wenig genauen Angaben beziehen sich auf „Nucleasen", also ein Enzymgemisch, dessen Komponenten sich vermutlich bezgl. des Aciditätsoptimums unterscheiden.

Über Aktivatoren ist bis jetzt nichts bekannt geworden. Nach Ergebnissen aus dem hiesigen Laboratorium beeinflussen Kalksalze die Wirkung der Nucleotidasen, für welche auch ein organisches „Co-Enzym" zu bestehen scheint.

Von einem genaueren Studium der Kinetik der am Nucleinstoffwechsel beteiligten Enzyme kann erst die Rede sein, wenn die einzelnen Enzyme vollständiger als jetzt voneinander geschieden sind. Ansätze zu einer Kinetik machte Pighini (H. 70). Dass die Spaltprodukte die „Nuclease"-Wirkung stark hemmen, betont Schittenhelm[2] auf Grund von Versuchen mit Enzym aus Rindermilz.

Einfluss der Temperatur: Den Angaben von Sachs (l. c. S. 316) wäre zu entnehmen, dass die hierhergehörenden Enzyme verhältnismässig wenig hitzeempfindlich sind (nach kürzerem Erhitzen auf 75° blieb ein Teil der Wirksamkeit erhalten).

W. Jones[3] fand, dass beim Kochen des wässerigen Extraktes von Schweinepankreas die Zerlegung der Hefenucleinsäure in Mononucleotide nicht gehemmt ist, indessen ist zweifelhaft, ob diese Reaktion rein enzymatisch ist. In diesem Zusammenhang sei auch noch auf die Befunde von W. Jones und Richards (Jl Biol. Chem. 17, 71; 1914) hingewiesen, nach welchen sie annehmen, dass Hefenucleinsäure durch frischen Schweinepankreas stufenweise über Dinucleotide zu Mononucleotiden hydrolisiert wird. Eine enzymatische Abspaltung von Phosphorsäure findet nach dem Kochen des Extraktes nicht mehr statt (Jones), die Nucleotidase ist also zerstört.

Einfluss von Licht- und Röntgen-Strahlung: Siehe Pincussen[4] und Momferratos-Floros, Biochem. Zs 126, 86; 1922. Uran-Photokatalyse: Neuberg, Bioch. Zs 13, 305; 1910.

Einfluss radioaktiver Stoffe: In Hinsicht auf die Gichttherapie hat Jastrowitz[5] die Wirkung des Thoriums X auf den Purinstoffwechsel und dabei auch auf die Pankreasnuclease untersucht, aber ohne endgültiges Ergebnis.

[1] Vergl. hierzu auch Arinkin, H. 53, 192; 1907.
[2] Schittenhelm und Wiener, H. 77, 77; 1912.
[3] W. Jones, Amer. Jl Physiol. 52, 203; 1920.
[4] Pincussen, Strahlentber. 3, 644; 1913.
[5] Jastrowitz, Biochem. Zs 94, 313 u. zw. 329; 1919.

5. Physiologische und pathologische Einflüsse auf den enzymatischen Nucleinstoffwechsel.

Thannhauser und Dorfmüller weisen in einer eingehenden Arbeit darauf hin, dass Hefenucleinsäure durch die Darmenzyme (wie auch durch milde, ammoniakalische Hydrolyse) in komplexe Nucleotide zerlegt wird, welche durch die Darmenzyme nicht weiter gespalten, sondern resorbiert und erst im Kreislauf abgebaut werden (sofern nicht Darmbakterien die Hydrolyse vorher weitergeführt haben) (H. 100 u. 102; 1917/18).

Nina Kotschneff[1] hat in Seren normaler und gravider Frauen die nukleolytischen Wirkungen mittels der optischen Methode verglichen und eine geringe, im Anfang der Schwangerschaft beginnende, zum Schluss zunehmende Steigerung dieser Wirkung beobachtet. — Bei Nephritis fand sie keine wesentliche Abweichung von normalen Verhältnissen.

Pankreasexstirpation bedingt nach W. Stawraki[2] eine bedeutende Abnahme der nucleolytischen Wirkung des Serums.

6. Andere Nucleinsäure-Spaltungen.

Die Enzyme, welche die zweite Art der Nucleotidspaltung bewirken, nach dem Schema: Phosphorsäure — Zucker ‡ Pyrimidin(Purin)base sind, da sie die typische Nucleosidspaltung an Phosphatnucleosiden bewirken, folgerichtig als Phosphat-Nucleosidasen zu bezeichnen. Zu diesen wäre z. B. ein Enzym zu rechnen, welches Inosinsäure in Ribose-Phosphorsäure und Hypoxanthin spaltet.

Nach de la Blanchardière (H. 87) enthalten Sojasamen ein Enzym, welches a-thymusnucleinsaures Natrium verflüssigt. Was sich ausser der PO_4-Abspaltung ereignet, ist unklar.

Gleichzeitige Spaltung (durch 1 Enzym?) von thymonucleinsaurem Na und von Kohlehydratphosphaten fand L. Rosenfeld (Chem. d. Zelle u. Gew. 12; 1925).

D. Der enzymatische Abbau der Nucleosidasen.

1. Substrate.

1. Ribose-Nucleoside. Man kann dieselben einteilen in Purin-Riboside und Pyrimidin-Riboside. Aus der Hefenucleinsäure entstehen die Purin-Riboside Guanosin und Adenosin und die Pyrimidin-Riboside Cytidin und Uridin (Konstitutionsformeln siehe S. 320 u. ff.).

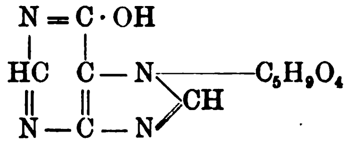
Freies Guanosin kommt nach Levene und Jacobs[3] im Pankreas vor.

Ferner sind isoliert:

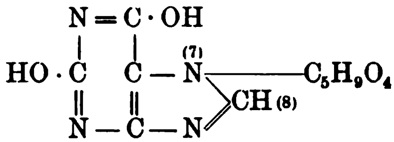
---

[1] Kotschneff, Biochem. Zs 67, 163; 1914.
[2] Stawraki, Biochem. Zs 69, 363; 1915.
[3] Levene und Jacobs, Biochem. Zs 28, 127; 1910.

Hypoxanthosin
= Inosin



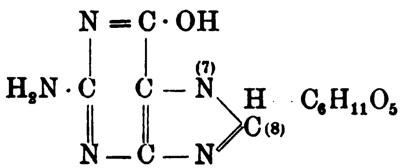
Xanthosin



Unsicher ist noch, ob die Ribose an (7) oder (8) gebunden ist.

2. Hexosen-Nucleoside. Hierher gehört das Guaninhexosid, welches Levene und Jacobs[1] aus der Thymusnucleinsäure isoliert haben.

Guaninhexosid[2]



Über synthetische Puringlucoside siehe E. Fischer und Helferich (Chem. Ber. 47, 210; 1914).

Inwieweit die Purin- und Pyrimidinbasen durch die gleichen Nucleosidasen auch aus den Mono- und Polynucleotiden direkt abgespalten werden, bleibt noch zu untersuchen.

2. Vorkommen der Nucleosidasen.

Die Wirkung dieser besonderen Enzyme des Nucleinstoffwechsels ist getrennt von den übrigen höchstens in einigen, sicher in sehr wenigen Fällen exakt gemessen worden; aber Angaben über Auftreten von Purin- und Pyrimidinbasen als enzymatische Spaltprodukte lassen den Schluss zu, dass Nucleosidasen in tierischen Organen, besonders in der Milz und im Pankreas vorkommen. Dagegen ist zweifelhaft, ob sie sich in der Leber finden. Im Darmsaft dürften sie nicht oder nur in geringer Menge vorhanden sein[3].

In einer sehr bemerkenswerten Arbeit haben Thannhauser und B. Ottenstein[4] die Einwirkung menschlichen Leberextraktes auf Nucleoside (Guanosin, Adenosin und Xanthosin) untersucht. Sie deuten ihre Versuchsergebnisse dahin, „dass auch im intermediären Stoffwechsel die Desamidierung und Oxydation der Nucleoside nicht bis zum Xanthosin bei intakter Nucleosid-

[1] Levene und Jacobs, Jl Biol. Chem. 12, 377; 1912.

[2] Guaninhexoside wären auf ihr Verhalten gegen Glucosidasen zu prüfen.

[3] Vgl. Martin Krüger und Schittenhelm, H. 35, 153; 1905. — Abderhalden und Schittenhelm, H. 47, 452; 1906.

[4] Thannhauser und Ottenstein, H. 114, 17; 1921. — Vgl. hierzu auch Schittenhelm, l. c.

bindung vor sich geht.“ Wahrscheinlich fällt auch im Stoffwechsel gleichzeitig mit der Desamidierung die Purinzuckerbindung auseinander.

Nucleosidasen höherer Pflanzen sind zwar noch nicht eingehender studiert; Nucleoside sind aber in Pflanzen und zwar zuerst von Andrlik 1909 und Schulze 1910 nachgewiesen worden. Nach Schulze (H. 66) ist Vernin identisch mit Guanosin. Vicin und Convicin (im Wicken- und im Rübensaft von v. Lippmann gefunden) sind Pyrimidinglucoside (Schulze und Trier, H. 70 und 76; 1911).

Auch Pilze und Mikroorganismen enthalten zweifellos Nucleosidasen.

Wichtige und eingehende Untersuchungen über Nucleosidasen verdankt man Levene[1] und seinen Schülern. Das Aciditäts-Optimum der Adenosin- und Inosin-Spaltung durch Nucleosidasen aus Milz und Niere liegt bei pH = 7,5. Die Nucleosidasen wirken spezifisch auf Ribose-Verbindungen; die Spaltprodukte (Ribose und Base) hemmen. Wegen der Kinetik sei auf die Original-Abhandlungen verwiesen, in welchen man auch Angaben über Reinigungsverfahren findet.

Am Nucleinstoffwechsel sind ausser den in diesem Kapitel behandelten Enzymen noch zwei andere Enzymgruppen beteiligt, nämlich Reduktasen und Oxydationsenzyme. Dieselben werden im 3. Abschnitt besprochen. Siehe auch 15. Kapitel dieses Abschnittes.

E. Methodik.

Bei den bisher angestellten Versuchen über den Einfluss der als Nucleasen bezeichneten Enzymgemische auf Polynucleotide, besonders auf Hefenucleinsäure kamen im wesentlichen drei Methoden zur Anwendung:

1. Die polarimetrische Methode. Sie wurde zuerst von Pighini[2] angewandt und von Neuberg[3] empfohlen, und zwar unter Hinweis auf die zweckmässige Verwendung Boehringerscher Nucleinsäure als Substrat.

„Löst man 2,0 g Nucleinsäure (Boehringer) in 80,0 ccm Wasser unter Zusatz von so viel KOH oder NH_3, dass gerade deutlich alkalische Reaktion auf Lackmus besteht, und füllt auf 100,0 ccm auf, so ist die Rechtsdrehung im 2 dm-Rohr genau gleich einer 3,0%igen Glucoselösung. Besonders bequem ist die Anwendung des Boehringerschen nucleinsauren Natriums, das sich völlig klar in Wasser löst. Die starken polarimetrischen Ausschläge machen die Benützung der Methode sehr bequem.“

Da die Spaltprodukte eine verschiedene Drehung besitzen und ihr gleichzeitiges Freiwerden nicht sichergestellt und nicht einmal wahrscheinlich ist, so lässt sich mit dieser bequemen Methode zwar eine Vorstellung von der enzymatischen Wirksamkeit des zu untersuchenden Saftes usw. gewinnen, aber eine exakte Berechnung des Vorganges bietet einstweilen noch Schwierigkeiten.

[1] P. A. Levene, Yamagawa und Weber, Jl Biol. Chem. 60, 693; 1924. — Levene und Weber 60, 707 u. 717; 1924. — Levene und Sobotka 65, 463; 1925.

[2] Pighini, H. 70, 85; 1910.

[3] Neuberg, Biochem. Zs 30, 505; 1911. — Siehe auch Amberg und Jones, Jl Biol. Chem. 10, 81; 1911.

2. Eine nephelometrische Methode, welche darauf beruht, dass Hefenucleinsäure durch verdünnte Eier-Albuminlösung ausgeschieden wird, haben Kober und S. S. Graves[1] ausgearbeitet; sie scheint bei Untersuchung der Spaltung der genannten Nucleinsäure befriedigende Resultate zu geben.

3. Zum qualitativen Nachweis von Nucleinasen hat man öfters a-thymusnucleinsaures Natrium verwendet, das in 4%iger Lösung die Eigenschaft hat, Gallerten zu bilden. Den Eintritt der Verflüssigung derselben hat man mit mehr oder weniger primitiven Mitteln gemessen.

Eine viscosimetrische Methode unter Benützung eines Auslauf-Viscosimeters wurde von P. de la Blanchardière[2] in Kossels Institut benutzt, um die Verflüssigung des a-thymusnucleinsauren Natriums zu verfolgen[3]; dabei wurde auch die Verflüssigung der Nucleinsäure und ihre Zersetzung durch Pankreasextrakt und Pankreassekret verglichen. Um die Zersetzung der Nucleinsäure zu verfolgen, hat sich der genannte Autor eines Verfahrens bedient, welches darauf beruht, dass die Nucleinsäure durch Kupfersalze quantitativ gefällt wird, dass hingegen ihre hauptsächlichen Zersetzungsprodukte (Purin- und Pyrimidinbasen) hierbei unter 100° nicht niedergeschlagen werden. „Fällt man also in einer Flüssigkeit, welche Nucleinsäure gleichzeitig mit ihren Zersetzungsprodukten enthält, die Nucleinsäure als nucleinsaures Kupfer und filtriert, so wird die Bestimmung des gesamten Stickstoffs im Filtrat eine Vorstellung von der Zersetzung der Nucleinsäure geben. Eine solche Methode kann natürlich nur als eine empirische betrachtet werden, weil man im besten Fall den Stickstoff nur in einem Gemisch bestimmt, und weil ausser den Endprodukten der Zersetzung noch Zwischenstufen vorhanden sein können, über deren Verhalten zu Kupfersalzen wenig bekannt ist.“ Wie zu erwarten ist, fand de la Blanchardière, dass die verflüssigende und die zersetzende Wirkung verschiedener Enzympräparate nicht immer parallel laufen. Was er schon in Erwägung zog, ist nunmehr zweifellos, nämlich dass es sich hierbei um wenigstens zwei verschiedene Enzyme handelt. Die Zersetzung ist auf Nucleosidasen zurückzuführen, während die Verflüssigung den Polynucleotidasen zuzuschreiben ist.

Bezüglich des chemischen Nachweises von Nucleotiden als Brucinsalze und von Nucleosiden als Pikrate siehe Thannhauser, H. 107, 157; 1919.

Da nach der S. 316 gegebenen Definition die Wirkung der Nucleotidasen in der Abspaltung der Phosphorsäure vom Nucleosidrest besteht, nach dem Schema

Phosphorsäure + Zucker-Pyrimidin(Purin)base,

[1] Kober und S. S. Graves, Jl Amer. Chem. Soc. 36, 1304; 1914.

[2] de la Blanchardière, H. 87, 291; 1913.

[3] An Stelle des Auslauf-Viscosimeters, welches sich für Messungen von Flüssigkeiten mit hoher innerer Reibung nicht eignet, empfiehlt sich vielleicht eine Anordnung, wie sie U. Olsson im Laboratorium des Verf. zur Messung der Stärkeverflüssigung verwendet hat (H. 119, 1; 1922).

so ist das einzig sichere und einwandfreie Verfahren zum Studium der enzymatischen Nucleotid-Spaltung die Bestimmung einer der beiden freiwerdenden Komponenten, Phosphorsäure oder Nucleosid unter Verwendung eines Mononucleotides als Substrat[1]. Man hat also entweder die Menge der Phosphorsäure gewichtsanalytisch oder massanalytisch (ev. durch eine Mikromethode) zu ermitteln (die Methoden hierzu siehe 1. Abschn., S. 64) oder das Nucleosid polarimetrisch zu messen.

Handelt es sich um den qualitativen Nachweis von Nucleosidasen (neben Nucleotidasen) in Organextrakten oder Presssäften, so kann man (falls kein Mononucleotid zur Verfügung steht) Hefenucleinsäure als Substrat zusetzen (2—5 g auf 100 ccm Flüssigkeit) und nach einer gewissen Reaktionszeit auf die Anwesenheit oder die Zunahme von Purinbasen oder Pyrimidinbasen prüfen. Zu diesem Zweck hat man zuerst die filtrierte Flüssigkeit mit Schwefelsäure zu versetzen, um etwa noch anwesende Nucleinsäure zu entfernen. Aus der filtrierten Lösung werden dann die Purinbasen mit Quecksilbersulfatlösung ausgefällt. Der aus Quecksilbersalzen bestehende Niederschlag wird nach Ansäuerung mit Schwefelwasserstoff zerlegt. Aus der wiederum filtrierten und von H_2S befreiten Lösung werden die Basen mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt. Die Silberfällung wird mit Salzsäure zerlegt und aus dem Filtrat werden die salzsauren Purinbasen gewonnen (Sachs, l. c.).

Auf die Purinbasen kann man dann noch mittels der Diazoreaktion von Burian[2] prüfen.

Über die für die Nuclealreaktion verantwortlich zu machenden Gruppen siehe Feulgen und Imhäuser H. 136 u. 148, 1; 1924/26.

[1] Mehrere derselben, und zwar alle vier Mononucleotide der Hefenukleinsäure, sind bereits rein und in krystallisiertem Zustand erhalten worden. Vgl. Levene, Jl Biol. Chem. 41, 1; 1920.

[2] Burian, Chem. Ber. 37, 696; 1904. — H. 51, 425; 1907. — Pauly, H. 42, 516; 1904.

14. Kapitel.

Urease.

Berücksichtigt man nur die Bruttoreaktion der Harnstoffspaltung

$$H_2N \cdot CO \cdot NH_2 + H_2O \rightarrow CO_2 + 2\,NH_3,$$

so ist die Urease zu den übrigen, im nächstenKapitel behandelten Desamidasen zu zählen, welche Säureamide in Säuren und Ammoniak hydrolysieren.

Indessen scheinen manche Tatsachen anzudeuten, dass die enzymatische Harnstoffspaltung nicht als einfache Hydrolyse verläuft, und die Unwirksamkeit der Urease gegen andere Säureamide spricht auch dafür, dass die Urease ein Enzym eigener Art ausmacht. Aus diesem Grund ist ihr ein besonderes Kapitel gewidmet worden.

A. Allgemeines über Ureasen.

1. Substrat.

Der Harnstoff wird durch Umkrystallisieren aus Wasser oder Alkohol leicht in reinem Zustand erhalten und ist dann durch seinen Schmelzpunkt 132,2—132,7° gekennzeichnet. Die Konstitution dieses Stoffes als Diamid der Kohlensäure ist so allgemein bekannt, dass eine Besprechung dieses Substrates vielleicht überflüssig erscheinen könnte. Indessen darf bei der Beurteilung des Verlaufes der enzymatischen Spaltung nicht ausser acht gelassen werden, dass noch andere Atomkombinationen möglich sind, nämlich (neben einer von Armstrong und Horton diskutierten Hydratform) besonders das Isomere (I) und die von Werner[1] in Betracht gezogene Form (II):

$$\text{(I)}\quad HN\!:\!C\begin{cases} OH \\ NH_2 \end{cases} \qquad\qquad \text{(II)}\quad HN\!:\!C\begin{cases} O \\ | \\ NH_3 \end{cases}$$

Ferner ist noch zu betonen, dass der Harnstoff bei der katalytischen Spaltung durch Säuren und Basen nicht als solcher reagiert, sondern unter Umlagerung zu Ammoniumcyanat[2], und dass auch in wässeriger Lösung ein Gleichgewicht zwischen Harnstoff und Ammoniumcyanat besteht, an welchem allerdings das Cyanat nur in sehr geringer Menge beteiligt ist. Die Kenntnis dieser Gleichgewichte

Harnstoff — Ammoniumcyanat

[1] Werner, Jl Chem. Soc. 103, 1010 u. 2275; 1913. — 113, 84; 1918. — 117, 1078; 1920. Siehe auch: Chemistry of urea. London, 1923.

[2] Fawsitt, Zs physik. Chem. 41, 601; 1902.

verdankt man J. Walker und Hambly[1], sowie G. N. Lewis und Burrows[2]. Mack und Villars[3] haben 1923 an diese Arbeiten mit neuen Untersuchungen angeknüpft.

Jedenfalls sind für die Kinetik der enzymatischen Harnstoffspaltung die Fragen wesentlich, ob dieser Vorgang tatsächlich eine monomolekulare Reaktion ist, oder ob der Bruttovorgang $CO(NH_2)_2 + H_2O \rightarrow CO_2 + 2NH_3$ nicht etwa — trotz eines mehr oder weniger guten Anschlusses an die Reaktionsgleichung erster Ordnung — in Teilreaktionen verläuft, etwa unter primärer Aufspaltung in carbaminsaures Ammonium

$$H_2N \cdot CO \cdot NH_2 + H_2O \rightarrow H_2N \cdot CO \cdot O \cdot NH_4,$$

welches dann durch Eintritt eines weiteren Wassermoleküls vollständig in die Endprodukte zerfällt. Für eine solche stufenweise Reaktion sind auch bereits starke Stützen beigebracht worden [E. Mack und D. S. Villers, l. c., sowie W. R. Fearon[4]], wie S. 352 eingehender besprochen wird.

Die Soja-Urease ist nach Armstrong auf den Harnstoff als Substrat beschränkt; Methylharnstoff und andere Harnstoffderivate werden nicht angegriffen (Proc. Roy. Soc. 85 und 86; 1912/13).

Mit negativem Resultat sind ferner mit Soja-Urease untersucht:

Alanin, Allantoin, Arginin, Benzamid, Glykokoll, Guanin, Hippursäure, Histidin, Kreatinin, Leucin, Tyrosin, Harnsäure und Biuret (?) (Takeuchi, 1909). Aminosäuren, Pepton und Casein (van Slyke, Jl Biol. Chem. 16). Das Verhalten von Guanidin bleibt weiter zu prüfen. Bakterien-Urease greift nach Jacoby weder Methylharnstoff, noch Thioharnstoff noch Acetamid an (Biochem. Zs 76).

Mit Robinia-Urease glaubt Pin Yin Yi (l. c.) eine Spaltung des asymmetrischen Dimethyl- und Diäthyl-Harnstoffs beobachtet zu haben.

2. Vorkommen.

Dass sich Urease in normalen Organen höherer Tiere findet, ist jetzt[5] festgestellt. Luck[6] fand nämlich in der Magenwand von Fleischfressern ein der Soja-Urease nahestehendes Enzym. Ferner enthält nach den Erfahrungen dieses Laboratoriums sowohl Niere[7] als Rattenblut Urease (Brandting). György und Stenström[8] fanden Urease im Harn eines 6 Monate alten Säuglings. Bakterienwirkung ist nicht ausgeschlossen (s. A. Lublin, Biochem. Zs 133). Die von Musculus 1876 in pathologischen Harnen gefundene Urease (C. r. 83) wurde von Pasteur auf Bakterien zurückgeführt.

[1] Walker und Hambly, Jl Chem. Soc. 67, 746; 1895.

[2] G. N. Lewis und Burrows, Jl Amer. Chem. Soc. 34, 1516; 1912.

[3] Mack und Villars, Jl Amer. Chem. Soc. 45, 501 u. 505; 1923.

[4] Fearon, Biochem. Jl 17, 84; 1923.

[5] Rovere glaubt eine Urease in Thymusdrüsen junger Kälber gefunden zu haben, Tanaka (Biochem. Zs 87) in Milz, Buetow in Hypophyse (Biochem. Zs 54) Steppuin in Leber (Biochem. Zs 146).

[6] Luck, Biochem. Jl 18, 825; 1924. — Luck und Seth, Biochem. Jl 19, 357; 1925.

[7] Siehe hierzu auch Mc Cance, Biochem. Jl 18, 486; 1924.

[8] György und Stenström, Biochem. Zs 128, 407; 1922.

Przylecki[1] teilt Befunde über das Vorkommen von Urease in Invertebraten (besonders Helix pomatia und Mytilus edulis) mit. Ob das Ausbleiben von Harnstoffausscheidung bei den Wirbellosen auf ihren Ureasegehalt zurückzuführen ist, bleibt festzustellen. Zweifellos spielt die Urease auch im Körper höherer Tiere (Blut; Euler und Mitarbeiter) eine wichtige spaltende und synthetische Rolle.

a) Höhere Pflanzen.

Als enzymreichstes Material werden die Bohnen folgender Pflanzen angegeben:

Canavalia ensiformis (Jackbohne, Schwertbohne): Annett[2], Mateer und Marshall[3], Ricinus (Castor-Bohne): Falk und Sugiura[4],

Soja hispida: Takeuchi[5], Plimmer, Bayliss u. a.

Robinia pseudacacia und andere Papilionaceen: Zemplén[6], Pin Yin Yi[7].

Nakagawa (Mitt. Med. Fak. Tokyo 28, 546: 1922).

Der Gehalt der Bohnen an Urease variiert in den einzelnen Arten bei Soja den Angaben von Annett (Biochem. Jl 8) zufolge nur wenig. (Siehe auch Wester[8], Chem. Weekbl. 16, 1552; 1919). In frischen Sojabohnen ist der Ureasegehalt konstant (Amer. Jl of Pharm. 92; 1920).

Das Alter der Bohnen scheint keine erhebliche Rolle zu spielen.

Dagegen wird mehrfach angegeben, dass der Ureasegehalt der Bohnen beim Reifen von Samen und Früchten [Kiesel und Troitzki[9]] und beim Keimen zunimmt, und letzteres entspricht auch den Erfahrungen des Verfassers (3 Tage Keimung). Der Ureasegehalt der Keimlinge ist sehr hoch. Über die Verteilung von Enzym und Co-Enzym beim Keimen gibt Onodera eine Beobachtung an (Biochem. Jl 9, 583; 1915).

Was die Lokalisation innerhalb des Samens betrifft, so fanden Onodera und Groll[10] die Urease in den innersten Samenteilen, nicht in der Schale.

Die folgende Tabelle enthält einige ältere Arbeiten über solche Pflanzen, bei welchen Urease in den Samen nachgewiesen werden konnte.

[1] Przylecki, Arch. intern. physiol. 20, 103; 1922.

[2] Annett, Biochem. Jl 8. 449; 1914.

[3] Mateer und Marshall, Jl Biol. Chem. 25, 297; 1916.

[4] K. G. Falk und Sugiura, Jl Amer. Chem. Soc. 35, 292 u. 36, 2166; 1914.

[5] Takeuchi, Jl Coll. agric. Tokyo 1, 1; 1909.

[6] Zemplén, H. 79, 229; 1912 u. Zs angew. Chem. 25, 1560; 1912.

[7] Pin Yin Yi, Diss. Berlin 1919. — Ber. d. deutsch. Pharm. Ges. 30, 178; 1920. — Siehe hierzu auch Thoms, ebenda, 30, 175; 1920.

[8] Wester, Chem. Weekbl. 16, 1548 u. 1552; 1919.

[9] Kiesel und Troitzki, H. 118, 247, 1922.

[10] Groll, Chem. Weekbl. 13, 254; 1916. — Polemik mit Mom (Chem. Weekbl. 13, 72) siehe ebenda 13, 333; 1916. Zitiert nach Chem. Zbl. 1916. Mom schrieb die harnstoffspaltende Wirkung der Sojabohnen Bakterien zu, vermutlich infolge einer Verwechslung (Beijerinck, Chem. Weekbl. 13, 285; 1916). — Siehe auch Wagenaar, Pharmac. weekbl. 51; 1924.

Familie	Art oder Pflanze	Verfasser	Schriftstelle
Papilionaceen	Phaseolus vulg.	Takeuchi	Jl agric. Tokyo 1, 1; 1909.
	Lupinus-Arten	Kiesel	H. 75, 169; 1911.
	„ „	Kiesel u. Troitzki	H. 118, 247; 1922.
	Lupinus albus	Muenck	Landw. Vers. 85, 398; 1914.
	Trifolium-Arten	Fosse	Soc. biol. 77, 129; 1914.
Apocynaceen	Strophanthus-Arten	Wabulenko	Landw. Vers. 82, 313; 1913.
Umbelliferen	Daucus	Fosse	Soc. biol. 77. 129; 1914.
	(nicht in Daucus carota)	Kiesel u. Troitzki	H. 118, 247; 1922.
Cannabinaceen	Cannabis sativa	Fosse	Soc. biol. 77, 129; 1914.
Graminaceen	Reis	Annett	Biochem. Jl 8, 449; 1914.

Anhaltspunkte über den relativen Urease-Gehalt gibt folgender Auszug aus einer Tabelle von Zemplén (H. 79).

Je 1 g der fein zermahlenen Samen wurde mit 200 ccm 1—2%iger Harnstofflösung (+ 2 ccm Toluol) 4—5 Tage bei Zimmertemperatur aufbewahrt; nach Zusatz von 25 ccm Kalkmilch wurde NH_3 abdestilliert und titriert. Die Tabelle gibt das der Enzymwirkung zuzuschreibende NH_3.

Namen der Pflanze	g NH_3	Namen der Pflanze	g NH_3
Amorphe fructicosa	0,861	Glycyrrhica glabra	0,070
Robinia pseudacacia	0,670	Colutea arborescens	0,066
Erbsenbaum, Caragana arborescens	0,551	Schottenklee, Lotus corniculatus	0,064
Lupinus albus	0,373	Stechginster, Ulex europaeus	0,062
Lupinus luteus	0,358	Meerkiefer, Pinus maritima	0,053
Goldregen, Cytisus laburnum	0,182	Ornithopus sativus	0,050
Tannenklee, Anthyllis vulneraria	0,133	Medicago sativa	0,050
Esparsette, Onobrychis sativa	0,122	Spartium scoparium	0,049
Morus alba	0,101	Galega officinalis	0,041
Canabis sativa	0,095	Käseklee, Melilotus coeruleus	0,029
Pferdebohnen	0,089	Pisum sativum	0,024
Trifolium incarnatum	0,085	Taxus baccata	0,012
Medicago lupulina	0,074	Capparis spinosa	0,008
Paliurus aculeatus	0,074	Buchweizen, Polygonum fagopyrum	0,007

Dass Papilionaceen besonders grosse Mengen von Urease enthalten, wird übereinstimmend von allen Forschern gefunden. Es erbot ein nicht geringes Interesse, den Reichtum der Samen dieser Pflanzenfamilie mit der Grösse und den Besonderheiten des starken Eiweissumsatzes, mit dem die Symbiose der Papilionaceen und der Knöllchenbakterien (Bacillus radicicola) zusammenhängt, in Beziehung zu setzen. Diesbezügliche Versuche wurden hier bereits 1923 zusammen mit Chr. Barthel begonnen. Etwa gleichzeitig teilte Werner in einem interessanten Brief an „Nature“ (Vol. 112) mit, dass sich Urease in Knöllchen-Wurzeln zahlreicher Leguminosen findet, nicht aber in knöllchenfreien Wurzeln. Siehe auch 3. Abschnitt.

Keine oder sehr geringe NH_3-Mengen erhielt Zemplén in Samen von: Goldregen-Hafer, Sommerweizen, Sommergerste, Cercis siliquastrum, Lathyrus odoratus, Stoppelrübe, Mohn (blauer), Sinapis alba, Helianthus annuus, Lein, Linse, Sommerroggen, weisse Hirse, Vicia sativa, Feldmais.

Hinsichtlich der Gramineen besteht eine ausgesprochene Verschiedenheit der Ergebnisse, welche noch der Aufklärung bedarf: Zemplén (l. c.) fand ihre Körner nämlich so gut wie ureasefrei, während Annett (1914) in Reis, Němec[1] in Weizen, Gerste, Hafer und Roggen Urease nachweisen konnten.

Auch sonst findet man viele sich widersprechende Ergebnisse. So fand Annett bei einer allerdings sehr oberflächlichen Prüfung keine Urease in Samen von: Phaseolus vulgaris, radiatus und mungo, Brassica campestris, Sesamum indicum u. a. — Mit einer etwas besseren Methodik konnte in folgenden Samen keine Spur einer Urease gefunden werden: Sida spinosa, Oryza sativa, Setaria italica, Pisum arvense, Phaseolus mungo und radiatus, Mucuna pruriens. Urease fehlt nach Kiesel (H. 118) in Allium cepa, Beta vulgaris und Phaseolus vulgaris.

Urease findet sich zwar in besonderem Masse, aber nicht ausschliesslich in Samen und Früchten höherer Pflanzen; nämlich auch in Blättern (grünen und etiolierten), Stengeln und Wurzeln, worüber Kiesel und Troitzki für Pisum sativum und Vicia sativa u. a. quantitative Versuche angeben. In Bambusschösslingen fand Kan Kato (H. 75) Ureasewirkung, in jungen Soja- und Erbsenpflänzchen Fosse (C. r. 158; 1914).

Bei langdauernden Versuchen mit enzymarmem Material ist die Möglichkeit der Infektion durch Pilze und Bakterien, welche in der Regel Urease enthalten, zu berücksichtigen.

b) Pilze und Bakterien.

Kikkoji[2] fand Urease im Hutpilz Cortinellus edodes.

In niederen Pilzen wurde Urease von Shibata[3] nachgewiesen, und zwar in Aspergillus niger. Dox[4] gibt eine grössere Anzahl von ureaseführenden Schimmelpilzen an, ebenso Kossowicz (Zs Gär. Phys. 1912). Kiesel und Troitzki (H. 118) fanden Urease in Aspergillus niger (und Boletus edulis). Goris und Costy[5] haben Urease in einer grossen Anzahl Ascomyceten und Basidiomyceten nachgewiesen. (Negative Resultate bei den Gattungen Amanita, Lepiota, Lycoperdon, Tricholoma, Clitocybe, Clitopilus, Psalliota, Coprinus und Paxillus, in welchen aber Harnstoff vorkommt.) Das Hymenium war am enzymreichsten.

Nachdem durch die Arbeiten von Fosse[6] (Ann. Pasteur 30, 1; 1916) und besonders durch die ausgezeichneten Forschungen von N. N. Iwanoff (Biochem. Zs 135, 1. — 136, 1. — 143, 62; 1923. — 154, 376; 1924. — 157, 229; 1925) die Verbreitung des Harnstoffs im Pflanzenreich dargetan ist, erhält

[1] Němec, Biochem. Zs 91, 126; 1918.
[2] Kikkoji, H. 51, 201; 1907.
[3] Shibata, Hofm. Beitr. 5, 385; 1904.
[4] Dox, Jl Biol. Chem. 6, 461. — U.S. Dep. Agr. Bull. 120; 1910.
[5] Goris und Costy, C. r. 175, 539; 1922.
[6] Siehe auch den ersten Nachweis von Harnstoff in Pilzen durch M. Bamberger und Landsiedl, Monatsh. f. Chem. 24, 218; 1903.

der Nachweis der Urease in Pflanzen, besonders Pilzen, eine neue Bedeutung, da sie nun auch als synthetisches Enzym in Betracht kommt. Eine Untersuchung an Lycoperdon-Arten wäre sehr erwünscht.

Lebende Hefen spalten Harnstoff nicht (P. Thomas, Ann. Pasteur 33, 777; 1919. — M. Sandberg, Biochem. Zs 128, 78; 1922). Für Sacchar. cervisiae Frohberg gibt Kiesel Ureasewirkung an (?).

Pasteur hatte bekanntlich 1862 die Harngärung auf die Wirkung eines Mikroorganismus, später Micrococcus ureae genannt, zurückgeführt[1]. Später wurden von Leube und Graser aus Luftstaub gewonnene stäbchenförmige Erreger der Harnstoffgärung beschrieben. Die Harnstoffspaltung durch B. fluor. liquef. haben Emmerling und Reiser 1902 erkannt (Chem. Ber. 35), diejenige durch Proteus vulgaris Schnitzler 1892, durch Bac. radicicola Beijerinck. Eine neue Untersuchung hat J. Arlington Anderson angestellt.

Wegen der Systematik der Mikroorganismen, Urokokken und Urobazillen, verweisen wir auf die Monographie von Miquel in Lafars Handbuch (3, 71; 1904—1906), sowie auf neuere Studien von Viehoever[2], sowie von Beijerinck[3] und Horowitz[4].

3. Darstellung.

A. Aus Pflanzensamen.

1. Lösungen. Als Ausgangsmaterial wurden meist trockene Sojabohnen verwendet. Es bleibt zu untersuchen, ob nicht die Anwendung enzymreicherer Bohnen, etwa von Robinia pseudacacia, Canavalia und Ricinus zu empfehlen ist und ob es sich auch bei diesen Samen lohnt, sie vor der Verarbeitung eine bestimmte Zeit keimen zu lassen und die Keimlinge zu verwenden.

Die Samen werden fein gemahlen und dann extrahiert, und zwar

a) mit 5—10 Teilen Wasser oder (nach van Slyke) mit neutraler oder sehr schwach saurer Phosphatlösung [Pufferlösung zur Aufrechterhaltung der geeigneten Reaktion oder nach Pin Yin Yi (Diss. 1919) mit 5 prozentiger Natriumacetatlösung (45°)] während kurzer Zeit, sei es direkt oder noch besser nach vorausgegangener Entfettung mittels Äther oder Petroleumäther (Armstrong und Horton [1912]) im Soxhletapparat. Die Dauer der Wasserextraktion war meist unnötig lang, 10—30 Minuten genügen.

Das von Fett befreite Pulver lässt sich in Wasser (mit wenig Alkoholzusatz) gut aufschlemmen. Die wässerigen Extrakte sind kaum länger als 1—2 Tage haltbar.

[1] Pasteur, Ann. chim. phys. (3) 64, 52; 1862. — Pasteur et Joubert, C. r. 83, 1; 1876.
[2] Viehoever, Zbt. Bakt. II, 39, 209; 1913.
[3] Beijerinck, Zbt. Bakt. II, 113; 1917.
[4] Horowitz, Ann. Pasteur, 30, 307; 1916.

Die zeitliche Abnahme der Wirksamkeit wird z. B. aus folgendem Versuch von Lövgren (Biochem. Zs 119, 215; 1921) ersichtlich: 200 g Sojabohnenmehl und 1 l Wasser 3 Stunden gerührt. Über Nacht sinken die unlöslichen Stoffe, dann wird die überstehende Flüssigkeit abgegossen; unter Toluol im Eisschrank aufbewahrt, war sie am zweiten Tag noch klar. Am dritten war sie hellgelb geworden (pH = ?) und ein reichlicher gelber Bodensatz hatte sich abgesetzt. An diesem und einigen folgenden Tagen wurden aus der tüchtig geschüttelten Flüssigkeit 2 ccm-Portionen genommen und filtriert. Das Filtrat + Waschwasser und der gewaschene Rückstand wurden teils für sich und teils vereint auf ihre Wirksamkeit geprüft.

Enzym	H_2O	m/2-Phosphat	1 n.-Harnstoff	Alter der Enzymlösung in Tagen						
	ccm	ccm	ccm	1	3	4	5	6	11	
Filtrat von 2 ccm der Enzymlösung	5	2	1	—	6	3,1	1,3	0,4	0,2	mg NH_3
Niederschlag v. 2 ccm d. Enzymlös.	5	2	1	—	—	3,9	2,7	0,6	0,3	mg NH_3
2 ccm der unfiltriert. Enzymlösung	5	2	1	12,8	—	11,9	8,3	—	0,7	mg NH_3

Totalvolumen: 10 ccm. — Harnstoffkonzentration: 0,1 Mol. pro Liter. — Temperatur: 17°. — Phosphatlösung: 165 ccm m/2-Na_2HPO_4 + 35 ccm m/2-KH_2PO_4; pH = 7,13, nach dem Zusatz des Enzyms etwa 7. — Reaktionszeit: 30 Minuten.

Wegen der starken Abschwächung der enzymatischen Wirksamkeit empfehlen van Slyke und Cullen das Arbeiten mit frisch bereiteten Enzymlösungen.

Um die Haltbarkeit zu erhöhen hat van Slyke[1] den Zusatz von neutralem Phosphatpuffer vorgeschlagen. Barendrecht[2] extrahiert 0,4 g Bohnenmehl mit einer Mischung von 7,28 g Na_2HPO_4 und 2,32 g KH_2PO_4 in 100 ccm bei 27°, und filtriert dann unter Zusatz von 0,4 g Kieselgur. Die wässerigen Extrakte enthalten grosse Mengen von Verunreinigungen. Extrahiert man Sojabohnenmehl z. B. zwei Stunden bei Zimmertemperatur mit 5 Teilen Wasser, so enthält die Enzymlösung rund 6% Trockensubstanz (B. Holmgren). Marshall[3] macht deswegen den enzymhaltigen Extrakt etwa 0,01 n. an Salzsäure und fällt durch 5—15 Minuten langes Erhitzen auf 35° die Eiweissstoffe zum Teil aus (ein Verfahren, das van Slyke aber nicht empfiehlt);

b) mit Glycerin [Jansen[4], Groll u. a.]. Diese Glycerinextrakte sind lange ohne Abschwächung wirksam, wie Verf. aus eigener Erfahrung bestätigen kann. Über die (nicht sehr starke) Hemmung der enzymatischen Wirksamkeit durch Glycerin siehe S. 350.

Wester[5]) kombiniert die Verfahren von Jansen und Marshall. Er extrahiert 25 g Sojabohnen 48 Stunden lang mit 200 g 50%igem Glycerin, setzt dann 26 ccm 0,1 n. Salzsäure zu, füllt mit 50%igem Glycerin auf 250 ccm auf und erwärmt auf 35°.

[1] van Slyke, Jl Biol. Chem. 19, 141; 1914.
[2] Barendrecht, Rec. Trav. Chim. Pays-Bas 39, 1; 1920.
[3] Marshall, Jl Biol. Chem. 14, 283; 1913. — 17, 351; 1914.
[4] Jansen, Chem. Weekbl. 12, 483; 1915.
[5] Wester, Pharm. Ber. 30, 163; 1920.

2. Trockenpräparate können aus Lösungen gefällt werden a) durch Alkohol [Takeuchi 1909, Hahn und Saphra[1]], b) durch Aceton (1 Teil Enzymlösung und 10 Teile Aceton) nach van Slyke und Cullen (Jl Biol. chem. 19; 1914). Der Niederschlag wird im Vakuum getrocknet und trocken zerrieben und ist dann unbegrenzt haltbar. Die aktive Substanz löst sich in Wasser; der geringfügige flockige Rückstand ist von keiner Bedeutung. Ein völlig lösliches Präparat wird durch nochmalige Acetonfällung der filtrierten Lösung erhalten [van Slyke und Zacharias[2]]. Diese Methode wurde auch von Onodera (1915), Rona sowie Kay angewendet[3].

Pin Yin Yi (Diss. 1919) fand starke Enzymschädigung durch Alkohol und Aceton. — Carnot, Gérard und Moissonier empfehlen Alkohol-Äther (Ann. Past. 35). Siehe auch Revoltella, Biochem. Zs 144, 229; 1924.

Auch durch Eindunsten wässeriger Bohnenextrakte hat man Trockenpräparate erhalten: van Slyke und Cullen (1914), Jacoby und Sugga[4]. Trocknet man im Faust-Heimschen Apparat durch einen Luftstrom bei Zimmertemperatur, so erhält man einen hornartigen Rückstand, der nach Pulverisieren in Wasser teilweise löslich ist.

B. Aus Pilzen und Bakterien.

Die ersten Extrakte sind von Musculus (1874), Lea[5] und Miquel[6] dargestellt, ferner sei auf die S. 336—339 angegebene Literatur verwiesen.

Musculus[7] hat Urease (1876) zum erstenmal aus alkalischem (bakterienhaltigem) Harn durch Alkoholfällung gewonnen.

Miquel (Lafars Handb. III, S. 82) gibt zur Darstellung der Bakterienurease folgende Vorschrift:

In einem geräumigen Gefäss, enthaltend wässerige Peptonlösung oder noch besser eine mit Pepton versetzte Bouillon, sät man, nachdem man für alkalische Reaktion durch Zugabe von Ammoniumcarbonat oder vorteilhafter 2—3 g Harnstoff pro Liter gesorgt hat, eine sehr kräftige Art von Harnstoffbakterien ein und hält dann die Zucht bei 30—35°. Der Zuwachs wird beschleunigt durch einen sehr schwachen Strom keimfreier Luft oder durch Anwendung flacher Gefässe. Nach einigen Tagen enthält die Flüssigkeit bereits reichliche Enzymmengen. Filtrieren der Bouillon durch ein Porzellanfilter verursacht nur geringen Verlust an Enzym. Die ureasehaltige Bouillon behält bei geeigneter Aufbewahrung (ohne fremde Infektion) ihr Spaltungsvermögen 3—4 Monate.

Ein Trockenpräparat von Bakterienurease erhielt Moll[8] aus Micrococcus ureae durch Alkoholfällung.

Eine Darstellung durch Trocknung von Bakterien beschreibt Jacoby[9]:

[1] Hahn und Saphra, Deutsche med. Wochenschr. 40, 430; 1914.
[2] van Slyke und Zacharias, Deutsche med. Wochenschr. 40, 1219; 1914.
[3] H. D. Kay, Biochem. Jl 17, 277; 1923.
[4] Jacoby und Sugga, Biochem. Zs 69, 116; 1915.
[5] Lea, Jl of Physiol. 6, 136; 1885.
[6] Miquel, C. r. 111, 397; 1890.
[7] Musculus, C. r. 82, 334; 1876.
[8] Moll, Hofm. Beitr. 2, 344; 1902.
[9] Jacoby, Biochem. Zs 84, 354; 1917. — Takahata, ebenda 140, 168; 1923.

Agar-Massenkulturen von nicht näher bezeichneten Urobakterien werden auf Tontellern ausgestrichen, am nächsten Tag wird die trockene Bakterienmasse pulverisiert. „Die (mit Ton verunreinigten) Pulver sind immer gut wirksam."

4. Reinigung der Enzympräparate und ihre Wirksamkeit.

Reinigungsmethoden sind für Urease erst in neuester Zeit im Laboratorium des Verf. ausgearbeitet worden. Als Sorptionsmittel für Verunreinigungen scheint Kieselgur in geringen Mengen verwendet werden zu können. Lövgren hat durch Kaolin seine Sojamehlextrakte nicht reinigen können[1].

Anwendung von Tonerdehydrat und Dialyse (Euler und B. Holmgren) ergab eine Verbesserung der Wirksamkeit auf Uf = 1 bis 10.

Die Wirksamkeit der bis jetzt erhaltenen Präparate ist also sehr gering. Nimmt man nach einem Vorschlag von Euler und Josephson[2] als Einheit der Wirksamkeit Uf = k · g Harnstoff : g Enzympräparat, so erhält man für einen ungereinigten Extrakt von Sojabohnen etwa $Uf = 10^{-2}$.

5. Wirksamkeitsbedingungen.

Während der Harnstoffspaltung ändert sich — falls die Lösung keine Puffer enthält — die Acidität durch das gebildete Ammoniak bedeutend, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit dadurch stark beeinflusst wird. Will man den Einfluss der Acidität auf den Reaktionskoeffizienten k studieren, so muss man entweder in Gegenwart einer hinreichenden Puffermenge arbeiten, sofern man nicht ausschliesslich einen Teil der Reaktion berücksichtigt, in welchem schon so viel Ammoniak gebildet ist, dass eine weitere Ammoniakentwicklung keine bedeutende Veränderung von pH hervorruft. Interpolationstafeln zur Ablesung der pH-Steigerung durch Ammoniak bei verschiedenen Phosphatmengen siehe Lövgren.

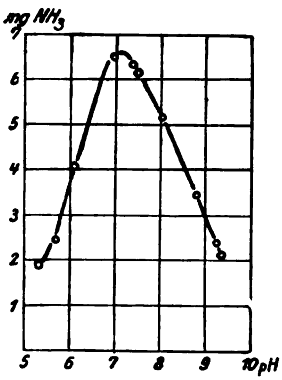


Fig. 45.
1 ccm Enzymlösung (0,02 g Acetonpräparat) + 10 ccm 2% Harnstoff + 10 ccm ⅛ mol. Phosphormischung. Totalvolumen 21 ccm. — Temp. 20°. — Reaktionszeit 30 Min.

Acidität. Nach älteren Versuchen von Armstrong wurde 1914 der Einfluss der Acidität auf die Ureasewirkung eingehender von Marshall jun. untersucht, der durch Verwendung von Indicatoren das Optimalgebiet zwischen pH = 6 und pH = 8 fand (l. c. S. 357). Van Slyke und seine Mitarbeiter haben diese orientierenden Versuche bald darauf mit der modernen Sörensenschen Methodik wesentlich erweitert. Die folgende Tabelle ist der Arbeit von van Slyke und Zacharias[3], S. 191, entnommen.

[1] Siehe auch Sunner und Graham, Zl Biol. Chem. 63, XLIII; 1925. — Proc. Soc. exp. Biol. u. Med. 21; 1924.

[2] Euler und Josephson, Chem. Ber. 56, 1749; 1923.

[3] Van Slyke und Zacharias, Jl Biol. Chem. 19, 181; 1914.

(Geschwindigkeit umgerechnet auf mg NH_3.)

pH	5,8	5,7	6.1	6,97	7,38	7,50	8,04	8.80	9,24	9,36
mg NH_3	1,86	2,43	4,07	6,50	6,86	6,14	5,18	3,46	2,39	2,13

Die Figur 1 zeigt, dass das Optimum der Reaktion sehr nahe am Neutralpunkt (pH = 7) liegt. Dieses Ergebnis wird auch durch zahlreiche andere Arbeiten bestätigt; Rona u. György; besonders Lövgren (Bioch. Zs 119).

Der Optimalpunkt der Azidität ändert sich, wie van Slyke gefunden und Lövgren später an einem ausführlicheren Material bestätigt hat, ein wenig (um etwa $^1/_2$ pH-Einheit) mit der Harnstoff-Konzentration der Lösung.

Folgende Tabelle ist der Arbeit von Lövgren (1921) entnommen, der erste Wert ist von ihm nach Barendrechts (Rec. 39) Resultat berechnet.

Harnstoff-konzentration Mol. pro Liter	pH-Optimum zwischen	Wahrscheinlicher Optimalpunkt
0,00167		7,90
0,00625	7,74—7,78	7,76
0,0125	7,66—7,72	7,69
0,025	7,55 – 7,65	7,62
0,05	7,50—7.60	7,55
0,1	7,40—7,50	7,48
0,2	7,30—7,50	7,41
0,4	7,30—7,40	7,35
0,8	7,25—7,35	7,27
1,6	7,15—7,25	7,20

Von der Konzentration des zugesetzten Phosphates ist die Lage der pH-Optima unabhängig, wie z. B. aus folgender Figur (Lövgren) hervorgeht.

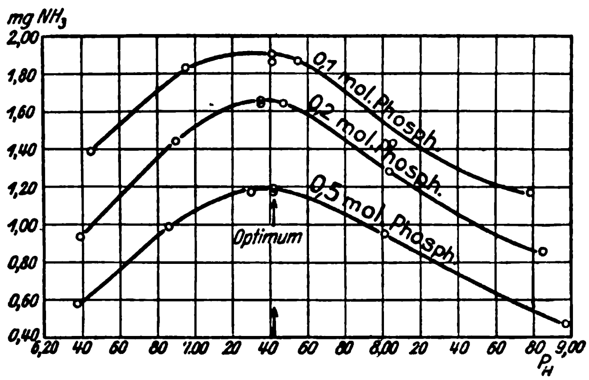


Fig. 46.

(Temp. 19,7°. — 1 ccm Enzymlösung + 5 ccm 1 mol. Phosphat + 4 ccm 0,5 n. Harnstoff.)

Die Enzymkonzentration hat auf die Lage des pH-Optimums keinen und auf den Verlauf der Optimalkurven wenig Einfluss.

Bei der Untersuchung der Wirkung verschiedener Säuren fand Onodera[1]) Zahlen, welche darauf hindeuten, dass neben der Aciditätswirkung auch gelegentlich noch die spezifische Wirkung der Anionen in Betracht kommt, z. B. bei Buttersäure.

Salzwirkung. Der Einfluss von Neutralsalzen ist systematisch zuerst von van Slyke und seinen Mitarbeitern und bald darauf auf Veranlassung von Bayliss durch Onodera[1] untersucht worden. In 2 n. Lösungen erniedrigen NaCl, $CaCl_2$, $BaCl_2$ die Ureasewirkung deutlich (van Slyke); in 0,1 n. Lösungen fand Onodera die Erniedrigung gering. Vermutlich handelt es sich hier in erster Linie um eine kleine Beeinflussung der Acidität durch die Neutralsalze (Vergrösserung des Dissoziationsgrades von NH_4OH durch NaCl) und in zweiter Linie um eine Beeinflussung des Dispersitätsgrades der kolloiden Enzymlösung.

Die Grösse dieses Einflusses geht aus folgenden Zahlen Onoderas (S. 560) hervor, die sich auf eine Lösung von 0,4 % Urease und eine Reaktionszeit von 17,5 Stunden beziehen:

Opt. Salz	Entwickelt ccm 0,1 n. NH_3
ohne Zusatz	12,10
NaCl	5,73
$BaCl_2$	5,52
$CaCl_2$	5,62

J. T. Groll (Proc. Akad. Amsterdam 20, 559; 1917/18) findet, dass der Einfluss der Kationen dominiert; sie hemmen in der Reihenfolge NH_4, K, (Ca, Mg), Na, Sr, Ba. — Schon 5% KCl setzt die Wirkung herab (Barendrecht, Rec. 39; 1920). — Die verstärkende Wirkung von KCN (Jacoby, Biochem. Zs 76, 275) dürfte eine Aciditätsbeeinflussung sein.

Inwieweit die Wirksamkeit der Urease an die Gegenwart von Neutralsalzen, besonders Phosphat gebunden ist, was durch die Dialyse-Versuche von Onodera nahegelegt wird, wird im hiesigen Laboratorium untersucht.

Neuere Versuche über den Einfluss von Neutralsalzen und Elektrolytmischungen (allerdings nicht konstantes pH) beschreibt Wester[2].

Aktivatoren. Zahlreiche Angaben über aktivierende Wirkung von Aminosäuren[3] und anderen amphoteren Elektrolyten sind, wie Rona und György[4] gezeigt haben, darauf zurückzuführen, dass die Lösung durch den Zusatz der betreffenden Stoffe näher an das pH-Optimum gebracht worden ist; in Gegenwart von Phosphatpuffer bleiben die Aktivierungen durch

[1] Onodera, Biochem. Jl 9, 544; 1915. — Kochmann, Biochem. Zs 151; 1924. (Aktivierung durch Ca.)

[2] Wester, Biochem. Zs 128, 279; 1922. — Zahlreiche kleinere Mitteilungen des gleichen Autors über Urease findet man in der Pharm. Zentralhalle und in Chemisch Weekblad.

[3] Besonders Jacoby u. Mitarb. Takahata, Biochem. Zs 140, sowie Katô, Biochem. Zs 136.

[4] Rona und György, Biochem. Zs 111, 115; 1920.

Aminosäuren aus. Entsprechende Wirkungen von Seren [Marg. Falk[1], Jacoby und Umeda[2], Neumann[3]] fanden Rona und György bei Phosphatpufferung sehr schwach, es ist also sehr wahrscheinlich, dass auch hier eine Aciditätsbeeinflussung etwa auch die komplexe Bindung eines vergiftenden Metalls vorliegt; ob sich daneben noch ein anderer spezifischer Effekt geltend macht, wie Jacoby[4] und sein Schüler Katô[5] meinen, ist noch nicht vollkommen aufgeklärt[6]. Bezügl. Atoxyl (Rona) vgl. S. 349.

Bemerkenswert ist der Befund von Onodera, dass Urease durch Dialyse ihre Wirksamkeit verliert, und dass die enzymatische Wirkung durch Mischung von Dialysat und Rückstand wieder hergestellt werden kann. Onodera sieht darin einen Analogiefall mit dem gegenseitigen Verhältnis der „Zymase" und des von Harden und Young entdeckten spezifischen Aktivators (Co-Zymase) und nimmt die Existenz eines Urease-Co-Enzyms (Co-Urease) an. Der Stoff, den Onodera als Co-Enzym bezeichnet, wird aber durch Erhitzen zerstört.

„Einstündiges Erhitzen auf 80° oder Erhitzen auf den Siedepunkt zerstören sowohl das freie als das gebundene Co-Enzym der Ureaselösung. Aber das Hinzufügen von Co-Enzym bzw. von frischer Urease belebte die Wirkung der Urease ausserordentlich stark."

Will man einen der beiden Teile der Urease als Co-Enzym bezeichnen, so erscheint es geeigneter, die von Onodera vorgeschlagenen Namen zu vertauschen.

Lövgren gibt Onoderas Versuche in folgender Weise wieder:

Es bedeuten:

E	frische Enzymlösung
d i	innere Flüssigkeit nach der Dialyse
d i N	Niederschlag davon
d i F	Filtrat
d a	äussere Flüssigkeit nach der Dialyse
d a N	Niederschlag davon
d a F	Filtrat

Eine Ziffer als Exponent bedeutet Erhitzung auf die angegebene Temperatur während 1 Stunde.

In allen Versuchen Onoderas ist das Totalvolumen 50 ccm; die Harnstoffkonzentration 0,15% (max. $NH_3 = 42,5$ mg); Enzym acetongefällt; Reaktionszeit 16—20 Stunden bei Zimmertemperatur; NH_3 nach Folin bestimmt. Dialysedauer 4—5 Tage.

Tab. III.	mg NH_3
E	26,7
d i	0,2
d a	0
d i + d a	0,4

Tab. IV.	
d i + d a	0,1
d i + d a + 1 ccm E	13,1
1 ccm E	1,0

Tab. V.	mg NH_3
d i F	1,62
d i N	1,50
d i F + d i N	5,22
d i F + 2 ccm E	27,29
d i N + 2 ccm E	14,79
2 ccm E	3,4

Tab. XVIII.	
$E^{80°}_{1\,Std.}$	0,1
$E^{8°}_{1\,Std.}$ + 1 ccm E	19,74

[1] Marg. Falk, Biochem. Zs 59, 298; 1914.
[2] Jacoby und Umeda, Biochem. Zs 68, 23; 1915.
[3] R. Neumann, Biochem. Zs 69, 134; 1915.
[4] Jacoby, Biochem. Zs 114, 152; 1921.
[5] N. Katô, Biochem. Zs 136, 498; 1923. Siehe auch Taubmann, Biochem. Zs 157; 1925.
[6] Nakagawa (Mitt. Med. Fak. Tokyo 28; 1922) nimmt Schutzwirkungen an.

	mg NH_3
1 ccm E	0,71
Durch einstündige Erhitzung bei 80° wird das Co-Enzym zerstört.	

Tab. XIX.

$E_0^{100°}$ (zum Kochen erhitzt) . . .	0
$E_0^{100°}$ + 1 ccm E	18,58
1 ccm E	0,73
Kochen zerstört das „Co-Enzym", nicht das Enzym.	

Tab. XX.

d i	0,44
d i + 1 ccm E	7,77
1 ccm E	0,10
d $i^{80°}_{1\ Std.}$	0,11
d $i^{80°}_{1\ Std.}$ + 1 ccm E	4,40
d $i_0^{100°}$	0,08
d $i_0^{100°}$ + E	2,86

Tab. XXI.

	mg NH_3
0,5 ccm E frisch	0,19
5 ccm E nach 15 Tagen Stehen bei 36,5°	8,79
5 ccm E nach 15 Tagen Stehen bei 36,5° + 0,1 E (frisch)	18,48
Das „Co-Enzym" wird beim Stehen zerstört.	

Tab. XXII.

2 ccm E (frisch)	2,89
2 ccm E (frisch) + 1 ccm Ochsenserum	29,19
1 ccm Ochsenserum	0
d i	0,44
d i + 1 ccm Ochsenserum . . .	2,06
5 ccm $E^{80°}_{1\ Std.}$	0
5 ccm $E^{80°}_{1\ Std.}$ + Ochsenserum . .	0,09
5 ccm $E^{80°}_{1\ Std.}$ + 1 ccm E	17,14

Ochsenserum enthält keine Urease. Alle diese Versuche sind ohne Puffer und ohne Messung von pH ausgeführt.

Auf Veranlassung des Verf. hat Lövgren einige eigene Versuche über den spezifischen Aktivator der Urease ausgeführt, welche hier referiert seien, da noch keine erschöpfende Untersuchung abgeschlossen ist.

Die Bezeichnungsweise ist die gleiche wie die oben für Onoderas Versuche angegebene.

7tägige Dialyse und Erhitzung.

Enzym	m/2-Phosphat ccm	H_2O ccm	5 m Harnstoff ccm	NH_3 mg
d i	2	25	1	7,8
d y	2	19	1	6,8
d $i^{80°}$	2	25	1	0,1
d $y^{80°}$	2	19	1	0,1
d i + d y . . .	2	17	1	22,2
d i + d $y^{80°}$ . .	2	17	1	17,2
d i^{80} + d y . .	2	17	1	7,3

Totalvolumen: 30 ccm. — Temperatur: 16°. — Reaktionszeit: 10 Stunden. — Aussenwasser 3mal gewechselt (bei d y). — d i in fliessendem Wasser im Dunkeln dialysiert.

Zusammenstellung:		
d i = 7,8	d i = 7,8	d $i^{80°}$ = 0,1
d y = 6.8	d $y^{80°}$ = 0,1	d y = 6.8
14.6	7,9	6,9
d i = d y = 22,2	d i + d $y^{80°}$ = 17,2	d $i^{80°}$ + d y = 7,3
Diff. = 7,6	9,3	0,4

Dass die Wirkung von d i + d y zusammen bedeutend grösser ist als die Summe deren Wirkungen, kann dadurch erklärt werden, dass durch die Dialyse eine teilweise Scheidung von Enzym und „Co-Enzym" stattgefunden hat. Nimmt man nun an, dass das Enzym schlechter dialysierbar ist als das „Co-Enzym" und dass das Enzym hochbeständig sei, so sollte

d i: Enzym + wenig Co-Enzym — d $i^{80°}$: nur Enzym
d y: Co-Enzym + wenig Enzym — d $y^{80°}$: nur wenig Enzym

enthalten. Demnach sollte die Wirkung von d y + d i$^{80°}$ grösser sein als die Wirkung von d i + d y$^{80°}$ — aber das Gegenteil ist tatsächlich der Fall. Nimmt man dagegen an, dass das „Co-Enzym", aber nicht das Enzym hitzebeständig ist, so enthalten:

d i: Enzym + wenig Co-Enzym; d i$^{80°}$: nur Co-Enzym (wenig)

d y: Co-Enzym + wenig Enzym; d y$^{80°}$: nur Co-Enzym.

Die Wirkung von d i + d y$^{80°}$ muss dann weit grösser ausfallen als die Wirkung von d y + d i$^{80°}$, was mit den Ergebnissen des Versuchs übereinstimmt.

Um einen eventuellen pH-Effekt zu eliminieren, machte Lövgren die folgenden Versuche mit der Phosphatkonzentration 0,5 mol. bei pH = 6,86. In jeder Probe kamen 5 ccm einer Phosphatmischung von 600 ccm mol.-Na_2HPO_4 + 250 ccm NaH_2PO_4.

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17°. — Enzym: 10 Tage in fliessendem Wasser im Dunkeln dialysiert. Niederschlag mitgenommen. — Kollodiumschlauch.

Dialysiertes Enzym ccm	$m/_1$-Phosphat ccm	H_2O ccm	Harnstoff	Harnstoffkonzentration Mol. pro Liter	Zeit Min.	NH_3 mg	Max. NH_3 mg	k	a k
2	5	1	2 ccm $m/_{16}$	0,0125	80	2,32	4,26	43	3
2	5	2	1 ccm $m/_4$	0,025	80	3,97	8,52	34	4
2	5	1	2 ccm $m/_4$	0,05	80	6,45	17,03	26	6
2	5	2	1 ccm $m/_1$	0,1	80	8,97	34,06	17	8
2	5	1	2 ccm $m/_1$	0,2	80	11,10	68,12	10	10
2	5	2	1 ccm 4 m	0,4	80	12,77	136,24	5,3	11
2	5	1	2 ccm 4 m	0,8	80	13,64	272,48	2,8	11
2	5	2	1 ccm 8 m	1,6	80	14,55	545	1,5	11,5

In den oberen Zeilen sank k bei verdoppelter Harnstoffkonzentration um etwa die Hälfte; a k zeigt in den letzten 4 Zeilen eine ganz geringe Steigerung.

Dann wurde festgestellt, welchen Einfluss eine zugesetzte Menge „Co-Enzym" — durch einstündige Erhitzung einer frischen Enzymlösung bei 80° erhalten — ausüben würde, wenn durch die starke Pufferkonzentration 0,5 mol. eine Verschiebung von pH ausgeschlossen wird.

Totalvolumen: 10 ccm. — Temperatur: 17°. — Phosphat $m/_1$ von pH = 6,86. — d i: Frische Enzymlösung, 16 Tage in fliessendem Wasser im Dunkeln dialysiert. — E$^{80°}$: Frische Enzymlösung, 60 Minuten bei 80° gehalten.

d i ccm	E$^{80°}$ ccm	$m/_1$-Phosphat ccm	H_2O ccm	Harnstoff	Harnstoffkonzentration Mol. pro Liter	Zeit Min.	NH_3 mg	Max. NH_3 mg	k	a k
					A.					
1	—	5	2	2 ccm $m/_{16}$	0,0125	100	0,58	4,26	6,4	0,4
1	—	5	2	2 ccm $m/_4$	0,05	100	1,18	17,03	3,1	0,8
1	—	5	2	2 ccm $m/_1$	0,2	100	2,05	68,12	1,3	1,3
1	—	5	2	2 ccm 4 m	0,8	100	2,52	272,5	0,4	1,6
1	—	5	2	2 ccm 8 m	1,6	100	2,62	545	0,21	1,7
										1,5
					B.					
1	2	5	—	2 ccm $m/_{16}$	0,0125	100	0,76	4,26	8,5	0,5
1	2	5	—	2 ccm $m/_4$	0,5	100	1,50	17,03	4	1,0
1	2	5	—	2 ccm $m/_1$	0,2	100	2,50	68,12	1,6	1,6
1	2	5	—	2 ccm 4 m	0,3	100	2,90	272,5	0,5	1,9
1	2	5	—	2 ccm 8 m	1,6	100	3,06	545	0,25	2,0
										1,8

Hier steigt a · k innerhalb der früheren Grenzen nur schwach.

Ein weiterer Versuch gab ein ähnliches Resultat.

Wie erwähnt, bedürfen also diese recht interessanten Verhältnisse weiterer Aufklärung.

Anorganische Paralysatoren.

Wie alle darauf hin untersuchten Enzyme wird auch Urease durch Schwermetallsalze mehr oder weniger vollständig inaktiviert. Besonders wirksam sind, wie immer, Quecksilbersalze — Hata[1], Jacoby[2] und Yamazaki[3] haben besonders Sublimat untersucht —, ferner Silbersalze[3], auch Nickelsalze[2], ferner Kupfer-, Blei- und Mangansalze[3] (letztere drei an Ricinus-Urease untersucht). Die meisten der diesbezüglichen Zahlenangaben dürften durch die (leider nicht gemessene) Änderung der Acidität der Enzymlösung beeinflusst sein. Diese Schwermetallsalzwirkungen erfolgen nach stöchiometrischen Verhältnissen und sind reversibel, d. h. das Enzym gewinnt seine Wirksamkeit wieder, wenn es vom Schwermetallsalz befreit wird. So kann Urease nach Quecksilbervergiftung z. B. durch Cyankalium regeneriert werden (Jacoby). Quantitative Vergiftungsversuche lassen sich zu Schlüssen über die Beschaffenheit des Enzyms natürlich nur verwerten, wenn die Enzymlösungen weitgehend gereinigt und das Enzym hinsichtlich seiner Wirksamkeit charakterisiert wurde. Versuche an gereinigten Ureaselösungen lagen bis jetzt nicht vor, die diesbezüglichen Untersuchungen im Laboratorium des Verfassers sind noch nicht abgeschlossen. Das eben erwähnte gilt auch für Fluornatrium, das Urease stark inaktiviert (Falk und Sugiura[4], Jacoby), sowie Jod (Wester, Chem. Weekbl. 1920).

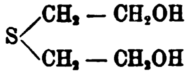
Alkaliarsenit hemmt nicht (vgl. Tabelle S. 349); Borsäure hemmt vermutlich nur, indem es den Abstand der Lösung vom optimalen pH vergrössert.

Organische Paralysatoren.

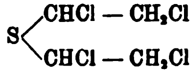
Toluol ist, wie zu erwarten, ohne Einwirkung. Phenol, Resorcin, Guajacol, Natrium-Salicylat und Saligenin hemmen in verdünnten Lösungen (0,04 m.) nur wenig[4]. Dagegen sind Hydrochinon und dessen Methyläther ausgesprochene Paralysatoren [H. E. Armstrong, Benjamin und Horton[5]]. Aldehyde inaktivieren (Armstrong, Benjamin und Horton l. c. 1913; Onodera, Biochem. Jl 9, 1915; Jacoby, Biochem. Zs 85; 1918), auch Glucose (van Slyke und Zacharias), zum Teil durch Bindung an den Harnstoff, ferner Mannit (Barendrecht). Dichlordiäthylsulfid und Sulfon

[1] Hata, Biochem. Zs 17, 156; 1909.
[2] Jacoby, Biochem. Zs 76, 275; 1916.
[3] Yamazaki, Sc. Rep. Tôhoku Imp. Univ. 9, 97; 1920.
[4] K. G. Falk und Sugiura, Jl Am. Chem. Soc. 36, 2166; 1914.
[5] H. E. Armstrong, Benjamin und Horton, Proc. Roy. Soc. B 86, 328; 1913.

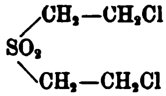
hemmen wenig, Tetrachlordiäthylsulfid hemmt stark. Thiodiglykol und Thiodiglykolacetat sind indifferent[1].



Thiodiglykol



Tetrachlordiäthylsulfit



Sulfon.

Eine starke Giftwirkung übt nach Jacoby das Senföl aus (Biochem. Zs 74, 107). Cyankalium und Blausäure wirken durch Veränderung der Acidität.

Freies Chinin, Atropin und Pilocarpin vergiften, die gemischten Basen Atropin und Pilocarpin wirken additiv auf Urease, nicht antagonistisch. Tannin hemmt nach Wester[2].

Die Kenntnis der Einwirkung organischer Arsenverbindungen verdankt man Rona und György[3], und zwar kamen zur Untersuchung Phenylarsinoxyd, Diphenylarsinchlorid, Diphenylarsinoxyd, Methylarsinoxyd und Atoxyl.

Die folgende Tabelle (vgl. l. c. S. 129) gibt bei 3stündiger Versuchsdauer den Umsatz des Harnstoffes in Prozenten.

Zusammensetzung der Lösung: 1 ccm 2%iger Harnstofflösung + 2 ccm 1/3 m. Phosphatgemisch + 2 ccm destilliertes Wasser (bzw. die entsprechende Giftlösung) + 0,2 ccm 1%ige filtrierte Ureaselösung. Acidität: pH (elektrom.) 7,27—7,34.

Substanz	Umsatz %	Substanz	Umsatz %
1. Phenylarsinoxyd (wässer. Lös.) . .	17,5	4. Methylarsinoxyd	9,7
„ (alkoh. Lös.) . .	4,8	5. Arsenige Säure[4]	23,9
2. Diphenylarsinchlorid (wässer. Lös.)	0	6. Atoxyl	30,8
„ (alkoh. Lös.)	0	Alkohol 1:4	22,1
3. Diphenylarsinoxyd (wässer. Lös.)	11,7	Destilliertes Wasser	21,9
„ (alkoh. Lös.)	4,3		

Wie ersichtlich hemmen die vier ersten Stoffe erheblich, bzw. vollständig, während Atoxyl aktiviert. Die Vergiftung durch Methylarsinoxyd macht sich noch bei ca. 1 Millimol/Liter der Substanz stark geltend.

Alkohole. Den nicht sehr stark hemmenden Einfluss dieser Stoffe fanden schon Armstrong, Marshall und van Slyke. In kleineren Konzentrationen üben Alkohole eine geringe aktivierende Wirkung aus, wie die folgende Tabelle von Onodera zeigt (Versuch mit 0,5% Urease).

[1] Rona und Petow, Biochem. Zs 111, 134; 1920. — Bezüglich der Giftwirkung der Chlorderivate des Thiodiglykols siehe Heubner, Naturwissenschaft 8, 247; 1919.

[2] Wester, Chem. Weekbl. 17, 222; 1920.

[3] Rona und György, Biochem. Zs 111, 115; 1920.

[4] Richtiger Na-Arsenit. Vielleicht würde arsenige Säure (auf der saueren Seite des Aciditäts-Optimums) hemmen.

Alkohol und Konzentration	ccm 0,1 n. NH_3 in 7 St.	Alkohol und Konzentration	ccm 0,1 n. NH_3 in 7 St.
—	5,99	0.2 m. Propyl	1.21
0,2 m. Methyl	6,08	0,025 m. Amyl	6,46
0,2 m. Äthyl	6,06		

Schon durch 5%igen Äthylalkohol fand Barendrecht[1] eine kleine Hemmung.

Auch die Wirkung von Glycerin ist nur gering (Wester, Spillmann). Einige Autoren bringen den Einfluss der höheren Alkohole mit ihrer Eigenschaft, die Oberflächenspannung des Wassers stark zu erniedrigen in Beziehung. Isocapillare Alkohole zeigen nämlich gleichen Effekt gegenüber Urease (Onodera, S. 568). Auch die hemmende Wirkung der Saponine wird auf die gleichen Ursachen zurückgeführt (Bayliss, Arch. Neerl. Physiol. 2, 1918).

Organische Lösungsmittel.

Auch in solchen Mengen, in welchen der zugesetzte Äthyl-Alkohol bereits einen erheblichen Teil des Lösungsmittels ausmacht (etwa 10—40 Volum.-%), ist sein verzögernder Einfluss nur gering. Der folgende Auszug aus einer Tabelle von Marshall jr.[2] (l. c., S. 360) zeigt die Grössenordnung dieses Einflusses.

5 ccm 2%ige Harnstofflösung mit Wasser oder Alkohol auf 95 ccm verdünnt, auf 35° erwärmt und versetzt mit 1 ccm Soja-Bohnen-Extrakt + 9 ccm Wasser. Reaktionszeit: 30 Minuten.

Volum.-% Alkohol:	0	10	20	30	40	60	80
% Harnstoff zerlegt:	23,1	22,8	21,7	20,8	19,0	15,5	6,9

Auch das längere Verweilen des Enzyms in wässrig-äthylalkoholischer Lösung bei Zimmertemperatur bewirkt nach Marshall keine grosse Schädigung.

1 ccm Soja-Bohnen-Extrakt wurde gemischt mit 9 ccm Alkohol und Wasser zur Herstellung des gewünschten Alkoholgehaltes. Die Mischungen blieben dann 2 bzw. 22 Stunden bei Zimmertemperatur stehen. Dann wurden dieselben mit Wasser auf 95 ccm verdünnt, auf 35° erwärmt und mit 5 ccm einer 5%igen Harnstofflösung versetzt. Der Fortschritt der Reaktion nach 60 Minuten ist durch die Anzahl ccm 0,1 n. HCl angegeben.

Volum.-% Alkohol:	0	10	20	30	40	60	80	90
Inkubationszeit 2 St.:	15,85	15,80	15,70	15,62	15,39	15,40	15,38	15,16
Inkubationszeit 22 St:	14,69	14,75	14,48	14,26	13,62	13,04	12,41	12,75

[1] Barendrecht, Rec. Trav. Chim. P. B. 39, 1; 1920.
[2] Marshall, Jl Biol. Chem. 17, 351 und zw. 360; 1914.

Nach N. N. Iwanoff[1] ist Urease in 95%igem Alkohol unlöslich, aber noch wirksam. Einen Versuch mit 30 Volum.-% Alkohol haben auch D. D. van Slyke und Zacharias angestellt; sie berechnen daraus, dass die beiden Konstanten c und d der van Slykeschen Formel (vgl. S. 358 und Tl. I, 4. Kap. B.) erniedrigt werden, und zwar d um 50%, c nur um 29%.

Aceton verhält sich gegenüber Urease ungefähr wie Äthylalkohol.

B. Kinetik.

1. Reaktions-Stufen und zeitlicher Verlauf.

Bevor wir auf die Formeln eingehen, welche für den zeitlichen Verlauf der Urease-Wirkung angegeben worden sind, müssen wir nochmals den schon einleitungsweise S. 335 erwähnten chemischen Vorgang der enzymatischen Harnstoff-Spaltung besprechen.

Zunächst können wir aus den Erfahrungen der chemischen Kinetik, besonders bezüglich der Verseifung der Ester zweibasischer Säuren den Schluss entnehmen, dass der Harnstoff nicht beide Amid-Gruppen gleichzeitig gegen OH austauschen wird, dass also die Hydrolyse nicht in einem Stadium nach dem Schema verläuft:

$$H_2N \cdot CO \cdot NH_2 + 2H_2O \rightarrow HO \cdot CO \cdot OH + 2\,NH_3 = CO_3\,(NH_4)_2$$

Vielmehr haben wir anzunehmen, dass die Reaktion, wie immer in ähnlichen Fällen, in zwei Stufen verläuft, von denen hier die Bildung von Ammoniumcarbamat die erste ist:

$$H_2N \cdot CO \cdot NH_2 + H_2O \rightarrow H_2N \cdot CO \cdot ONH_4, \qquad (1)$$

welcher dann die Spaltung nachfolgt

$$H_2N \cdot CO \cdot ONH_4 + H_2O \rightarrow CO_3\,(NH_4)_2 \qquad (2)$$

Es würden also nur noch die Fragen zu beantworten sein a) mit welchen relativen Geschwindigkeiten die beiden Vorgänge verlaufen und b) welche der beiden Reaktionen von der Urease katalysiert wird, wenn nicht Untersuchungen der nicht-enzymatischen Harnstoffspaltung Tatsachen ergeben hätten, welche hier zunächst eine kurze Besprechung erfordern.

Gestützt auf eine ältere Untersuchung von J. Walker und Hambly (1895) hatte Fawsitt[2] 1902 gezeigt, dass die Hydrolyse des Harnstoffs durch Säuren, Alkalien oder kochendes Wasser nicht als einfache Hydrolyse verläuft, sondern dass als 1. Stufe bzw. als Zwischenprodukt Ammoniumcyanat auftritt, welches hierauf zu Ammoniumcarbonat hydrolysiert wird, gemäss den auch durch E. A. Werners Arbeiten (1918—1920) gestützten Formeln:

$$H_2N \cdot CO \cdot NH_2 \rightarrow HNCO + NH_3$$

und

$$HNCO + H_2O \rightarrow NH_3 + CO_2.$$

---

[1] N. N. Iwanoff, Biochem. Zs 150, 108; 1924. — Siehe auch Bayliss, Jl of Physiol. 50, 85; 1915. — Jacoby, Biochem. Zs 158, 334; 1925.

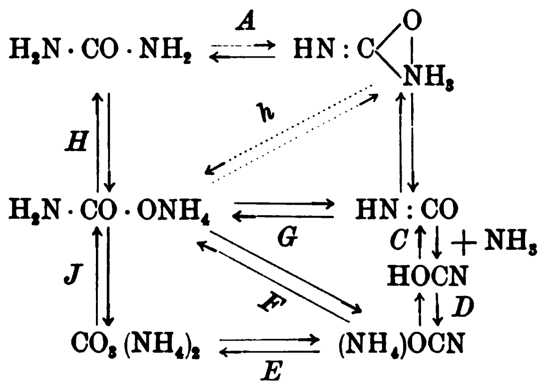
[2] Fawsitt, Zs physik. Chem. 41, 601; 1902. — Burrows und Fawsitt, Jl Chem. Soc. 105, 609; 1914.

Kürzlich (1923) hat nun Fearon[1] auch nach der Einwirkung von Urease auf Harnstoff Cyansäure als Silbersalz aus der Lösung isolieren können; im Verlauf der enzymatischen Reaktion erreicht die Menge nachweisbarer Cyansäure bald ein Maximum. Allerdings sind die Mengen Cyanat im Verhältnis zum angewandten Harnstoff nur klein (0,1 g Silbercyanat aus 1 l 5%iger Harnstofflösung). Die Gründe, welche Fearon für die Annahme beigebracht hat, dass die kleinen Mengen Cyansäure nicht ein Nebenprodukt, sondern das Zwischenprodukt der Gesamtreaktion sind, scheinen dem Verf. nicht beweisend, und ich kann also der Auffassung, dass die Urease ein dissoziierendes Enzym ist, welches der Harnstoff nach der Formel spaltet:

$$HN:C\left\langle\begin{matrix}O\\ |\\ NH_3\end{matrix}\right. \longrightarrow \begin{matrix}HN:C:O\\ +\\ NH_3\end{matrix}$$

nicht beistimmen, besonders nachdem Mack und Villars[2] gezeigt haben, dass bei der Einwirkung von Ureasen auf Harnstoff Ammoniumcyanat neben Ammoniumcarbonat entsteht (vgl. auch S. 354).

Mack und Villars haben an eigene, bemerkenswerte Versuche eine Kritik angeschlossen, welche die Sachlage gut beleuchtet:



Der Übergang des Harnstoffs in Ammoniumcyanat durch die Reaktionen *A B C D* ist sehr langsam. Von den vier Teilvorgängen verläuft *D* (als einfache Neutralisation) sehr schnell. Auch *A* und *C*, tautomere Umlagerungen, gehen wahrscheinlich schnell vor sich. Somit bleibt *B* als diejenige Reaktion übrig, deren Geschwindigkeit diejenige des Totalumsatzes *A B C D* bestimmt. Indessen kann *B* nicht die durch die Urease katalysierte Reaktion sein, denn 1. wird mit den Versuchen von Mack und Villars die entgegengesetzte Reaktion: Cyanat → Harnstoff durch das Enzym nicht katalysiert und 2. sind die Reaktionen *E* und *FJ* langsamer als *B* (nach den Ergebnissen von Walker-Kay und von Werner). Somit kann die Urease keinen Teilvorgang

[1] Fearon, Biochem. Jl 17, 84; 1923.

[2] Mack und Villars, Jl Amer. Chem. Soc. 45, 505; 1923.

der Kette *ABCD* katalysieren. Das Stadium *E* scheidet (in der Reihe *ABCDE*) aus, da *B* viel langsamer verläuft als die gemessenen Umwandlungsgeschwindigkeiten Harnstoff → Ammoniumkarbonat in Gegenwart von Urease. *J* verläuft zwar beinahe augenblicklich in saurer Lösung, aber sehr langsam in neutraler oder alkalischer Lösung. Der Vorgang *F* muss, wenn er überhaupt eintritt, nach Walkers und Kays Versuchen sehr langsam verlaufen. Die Reihen *ABCDE* und *ABCDFJ* sind damit ausgeschlossen. Nun ist *H* als ausserordentlich langsame Reaktion bekannt, und da *E* sehr langsam ist, so sind die beiden Ketten *HFE* und *HGCDE*, welche beide *H* und *E* enthalten, unmögliche Vorgänge.... „Wir sind nun beschränkt auf die Möglichkeiten *ABGJ* und *HJ*. Es ist aber bereits gezeigt worden, dass *B* nicht die katalysierte Reaktion ist und jede andere Stufe von *ABGJ* ist wegen der ausserordentlichen Langsamkeit von *B* ausgeschlossen."

Es bleiben nun die Stufen *H* und *J* über. Mack und Villars haben nun an 0,1 mol. Harnstofflösung und 0,1% Urease bei 25° die Harnstoffspaltung nach der Stufe *HJ* mit der Methode von Fosse verfolgt und gleichzeitig den Einfluss der Urease auf die Bildung von Ammoniumcyanat studiert. Während nun Armstrong und Horton behaupteten, dass Urease die Bildung von Cyanat hindert, fanden die amerikanischen Autoren, dass die Umwandlung Harnstoff → Ammoniumkarbonat von der Bildung von Ammoniumcyanat begleitet wird, welche vermutlich unbeeinflusst von Cyanat verläuft.

Die Geschwindigkeit der Reaktion Ammoniumcarbamat → Ammoniumcarbonat verläuft nach einer von Faurholt[1] in Bjerrums Laboratorium ausgeführten Untersuchung in schwach saurer Lösung in weniger als einer Sekunde.

Auch in annähernd neutraler Lösung (beim Wirkungsoptimum der Urease, pH = 7,4) ist die Zersetzungsgeschwindigkeit noch gross, es wird aber ein Gleichgewichtszustand erreicht, welcher vorwiegend Carbonat enthält. Dass die Urease die Stufe *J* nicht beeinflusst, hat schon Bayliss gezeigt.

Aus den Versuchen von Yamasaki[2] — die freilich analytisch noch vorfeinert werden müssen — zeigt sich, dass Carbamat als Zwischenprodukt bei der enzymatischen Harnstoffspaltung gebildet wird; die Carbamatkonzentration erreicht im Verlauf der Harnstoffspaltung ein Maximum und nimmt dann wieder ab.

Als Folgerung aus obiger Überlegung ergibt sich, dass es die Stufe *H* oder *h* ist, welche von der Urease beschleunigt wird. Ammoniumcyanat wird auch bei der enzymatischen Harnstoffspaltung als Nebenreaktion gebildet.

---

[1] Faurholt, Zs anorg. Chem. 120, 85; 1921. — Siehe auch Fenton, Proc. Roy. Soc. 39, 386; 1886.

[2] Yamasaki, Sc. Rep. Tôhoku. Univ. 9, 97; 1920.

Die enzymatische Reaktion

Harnstoff ⇄ Ammoniumcarbamat

ist reversibel; wir werden auf die Synthese noch besonders zurückkommen.

Den nun zu besprechenden kinetischen Untersuchungen muss noch folgende Bemerkung vorausgeschickt werden. Bei den meisten der hier in Betracht kommenden Untersuchungen wurde die Harnstoffspaltung durch die Messung des aus der Harnstofflösung nach Zusatz von Soda oder Pottasche austreibbaren Ammoniaks nach der Methode von Folin (vgl. Methodik S. 372) verfolgt. Es fragt sich nun, was dabei bestimmt wird.

a) Ohne weiteres wird freigemacht:

1. Das gesamte Ammoniak des Ammoniumcarbonats,
2. das Ammonium des Ammoniumcarbamats,
3. das Ammonium des als Nebenprodukt gebildeten Ammoniumcyanates.

b) Nach sekundärer Einwirkung der alkalischen Lösung

4. das aus der NH_2-Gruppe des Carbamats stammende Ammoniak,
5. das durch Umwandlung des Cyansäurerestes freiwerdende Ammoniak.

Die unter b) angegebenen Ammoniakmengen entstehen nicht augenblicklich, und ob sie im Verlauf des Luftdurchleitens quantitativ gebildet werden und in die vorgelegte Schwefelsäure übergehen, hängt von den speziellen Versuchsbedingungen ab.

Jedenfalls stammt aber die in jeder Probe gefundene Ammoniakmenge aus verschiedenen Reaktionsstadien her, und dies darf bei der genauen, rechnerischen Verwertung der gefundenen Zahlen nicht übersehen werden.

Da die Umwandlung Ammoniumcarbamat — Ammoniumcarbonat bei der für Urease optimalen Acidität recht rasch verläuft, wird man im allgemeinen keine grossen Fehler begehen, wenn man die gefundene Ammoniakmenge mit dem nach Stufe H (oder h) zersetzten Harnstoff proportional setzt. Weitere Prüfungen sind aber erforderlich.

Der zeitliche Verlauf der Harnstoffspaltung.

Die ersten Versuche, eine Einsicht in das zeitliche Fortschreiten der Reaktion zu gewinnen, verdankt man Moll[1]. Etwa ein Dezennium später haben Armstrong und seine Mitarbeiter[2] einen Anschluss des Reaktionsverlaufes an die für monomolekulare Reaktionen gültige Formel gesucht, aber nicht gefunden. Da wir nunmehr wissen, dass einfache Beziehungen nicht zu erwarten sind, wenn wir nicht die Urease durch Konstanthaltung der

[1] Moll, Hofm. Beitr. 2, 344; 1902.

[2] H. E. Armstrong und Horton, Proc. Roy. Soc. B. 85, 109; 1912 und 86, 561; 1913. — H. E. Armstrong, Benjamin und Horton, 86, 328; 1913.

optimalen Acidität durchweg auf das Maximum ihrer Wirksamkeit einstellen, so lassen sich die genannten Arbeiten in kinetischer Hinsicht nicht mehr verwerten, und wir gehen gleich zu den Untersuchungen D. D. van Slykes und seiner Schüler über, welche den Einfluss der Wasserstoffionen-Konzentration berücksichtigt haben. Besondere Massregeln zur Aufrechterhaltung einer bestimmten Acidität sind ja bei dieser Enzymreaktion um so notwendiger, als die Lösung mit fortschreitendem Grad der Harnstoffspaltung immer ammoniakreicher und also um so alkalischer wird; so änderte sich pH z. B. in einer 5%igen Harnstofflösung nach Zusatz von Enzym von 6,5 bis 9,3 (van Slyke und Zacharias, S. 184).

„Durch Zufügen einer Mischung von primärem und sekundärem Phosphat in Mengen, welche im Verhältnis zum gebildeten Ammoniak gross sind, kann der Einfluss des letzteren auf die Acidität der Lösung gegen die alkalische Seite hin fast vollständig[1] aufgehoben werden. Unter diesen Bedingungen beeinflusst Ammoniak die Reaktionsgeschwindigkeit nicht.“

$^1/_2$-molekulare Phosphat-Konzentration.

0,5 m. Na_2HPO_4	70 ccm	pH zu Anfang	6,97
0,5 m. KH_2PO_4	30 „	pH nach 260 Minuten	7,16
10%ige Urease-Lösung	1 „	Temperatur	20°
Harnstoff	1 g		

Minuten	x 1 n. NH_3 per Liter	Mittlere Geschwindigkeit x : t	$10^4/t \log \frac{a}{a-x}$ (ber. Euler)
7	3,4	0,48	21
14	6,8	0,48	22
25	12,2	0,48	22
33	15,2	0,46	22
55	26,4	0,48	25
66	28,7	0,44	22
85	39,7	0,47	26

„Das Enzym — schreiben van Slyke und Zacharias (S. 190) — zersetzt während eines erheblichen Teiles des Reaktionsverlaufes per Minute die gleiche Menge Harnstoff, und die Geschwindigkeitskurve wird eine gerade Linie.“ „Diese Beziehung bleibt aber nicht bestehen, bis der gesamte Harnstoff zersetzt ist, sondern nur so lang er sich in genügendem Überschuss befindet“.

Wir führen ferner eine Versuchsreihe von Barendrecht (Rec. 39,1, und zwar 15, 1916) an, die allerdings mit der sehr geringen Harnstoffkonzentration 0,02% angestellt ist (um pH konstant zu halten); deshalb sind die

[1] Die völlige Ausschaltung des Einflusses der fallenden h ist aber nur möglich, wenn man sich, wie van Slyke getan hat, auf kleine Harnstoffkonzentrationen (unter 0,2 m.) beschränkt und hohe Pufferkonzentrationen (0,5 m. PO_4) verwendet; in späteren Arbeiten waren diese Bedingungen nicht immer eingehalten. Bei Verwendung hoher Konzentrationen von Phosphatpuffer ist aber die hemmende Wirkung des PO_4-Ions zu beachten.

Fehlergrenzen der Werte der Spalte 2 zu gross, um eine genaue Prüfung der Formel zuzulassen.

3 g Soja in 100 ccm mit 7,28 g Na_2HPO_4 2 aq + 2,32 g KH_2PO_4. — 50 ccm des Filtrates gemischt mit 100 ccm H_2O + 1,92 g Na_2HPO_4 + 7,68 g KH_2PO_4. Temperatur 27°. pH = 6,13.

Minuten	0,02 n. NH_3 korr. ccm	x	$k \cdot 10^4 = 10^4/t \log \frac{a}{a-x}$	m (Barendrecht)
60	0,6	0,15	11,8	0,00090
90	0,8	0,20	10,8	82
120	1,0	0,25	10,4	79
150	1,25	0,31	10,7	82
180	1,45	0,36	10,8	82
210	1,7	0,425	11,4	87
240	1,85	0,46	11,1	84
270	2,1	0,525	12,0	90
315	2,2	0,55	11,0	83
370	2,4	0,60	10,7	81

Wir geben von den zahlreichen Versuchen Barendrechts noch einen zweiten an, der bei optimaler Acidität angestellt ist (Tab. 9, S. 16).

0,75 g Soja in 100 ccm mit 7,28 g Na_2HPO_4, 2 aq + 2,32 g KH_2PO_4. — 50 ccm des Filtrates gemischt mit 100 ccm H_2O + 8,64 g Na_2HPO_4, 2 aq + 0,96 g KH_2PO_4. pH = 7,21.

Minuten	0,02 n. NH_3 korr. ccm	x	$k \cdot 10^4$	m (Barendrecht)
20	0,95	0,238	60	0,00060
40	1,70	0,425	60	58
60	2,30	0,575	62	57
80	2,78	0,695	64	57
100	3,15	0,788	67	57
120	3,45	0,86	71	58
150	3,65	0,91	70	55
180	3,75	0,94	68	52
210	3,90	0,975	76	56

Bei Versuchen mit pH = 7,52 und 7,64 sowie 7,75 fand Barendrecht Werte für x, aus welchen sich zeitlich ziemlich stark ansteigende Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung ergaben.

Die Geschwindigkeits-Konstanten m der letzten Spalte in den beiden letzten Tabellen beziehen sich auf die von Barendrecht aufgestellte Formel:

$$\frac{n\,c}{0{,}434} \log \frac{1}{1-x} + a\,x = m\,t,$$

in welcher bedeutet: c die Konzentration der Wasserstoffionen (g in 100 ccm)
n den Absorptionskoeffizienten der Wasserstoffionen (1 g H˙ absorbiert n-mal mehr Strahlung als 1 g Harnstoff).

Diese Formel ist abgeleitet unter der Annahme, dass die aktive Urease (wie auch andere Enzyme) eine Strahlung aussendet, welche in einem gewissen Abstand vom Enzymmolekül

wirksam ist und sowohl vom Substrat[1] als von den Wasserstoffionen absorbiert wird. Da bisher keine Tatsachen vorliegen, welche es wahrscheinlich machen, dass Enzyme sich bezüglich einer eventuellen Emission von Strahlen anders verhalten als andere organische Katalysatoren, so kann ich die Theorie von Barendrecht einstweilen nicht als genügend begründet ansehen; ich verweise übrigens auf das im I. Teil der 3. Auflage dieses Buches Gesagte.

Was die Konstanz der Reaktionskoeffizienten 1. Ordnung $k = 1/t \ln a/a-x$ betrifft, so weichen die oben angegebenen Versuche nicht sehr stark von der Forderung der Theorie ab.

Das gleiche gilt z. B. für die folgenden Versuche von Yamasaki (1920, S. 119). Die k-Werte sind mit natürlichen Logarithmen berechnet[2].

Totalvolumen: 100 ccm. Temp. 25°. Harnstoff-Konzentration = 0,0200. g-Urease = 0,05 g.

a			b		
Minuten	Harnstoff-Konz.	$k \cdot 10^4$	Minuten	Harnstoff-Konz.	$k \cdot 10^4$
0	0,02000	—	0	0,02000	—
45,5	0,01892	12,0	45,9	0,01864	15,5
96,6	0,01624	21,6	96,2	0,01776	12,4
157,5	0,01574	15,2	158,0	0,01586	14,7
217,5	0,01444	15,0	216,0	0,01442	15,7
278,4	0,01330	14,9	273,8	0,01300	15,7
345,9	0,01238	13,9	346,0	0,01176	15,3

Bei anderen Reihen ist die Konstanz der k-Werte weniger deutlich oder kommt gar nicht zum Vorschein. Dies ist z. B. beim ersten der folgenden Versuche von Lövgren (1921, S. 269) der Fall.

Der theoretische Teil der Arbeit von Yamasaki verdient besondere Erwähnung. Er betont nämlich den stufenweisen Verlauf der Reaktion

$$\underset{M_1}{H_2N \cdot CO \cdot NH_2} \xrightarrow{k_1} \underset{M_2}{H_2N \cdot CO_2NH_4} \xrightarrow{k_2} \underset{M_3}{CO_3(NH_4)_2}$$

Bezeichnet man mit $a-x_1$ die Konzentration von M_1 zur Zeit t
„ $a-x_2$ „ „ „ M_2 „ „ t

und mit k_1 und k_2 die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten, so erhält man durch Integrierung der Differentialgleichungen

$$\frac{dx_1}{dt} = k_1 (a - x_1) \qquad \text{und} \qquad \frac{dx_2}{dt} = k_2 (a - x_2)$$

die Ausdrücke, welche gestatten, C_{M_1}, C_{M_2} und C_{M_3} zu bestimmen, wenn k_1, k_2 und a bekannt sind.

[1] Siehe auch Barendrecht, Zs physik. Chem. 40, 456; 1904 und Biochem. Jl 7, 559; 1913.

[2] Yamasaki puffert mit Ammoniumcarbonat bzw. mit einem CO_2-Strom (wie früher Armstrong).

Wenn
$$t = \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{k_2 - k_1},$$
so hat C_{M_2} sein Maximum und C_{M_3} die Inflexion. Die Konzentration von M_3 wird vernachlässigt werden können, wenn t sich 0 nähert.

Die Konzentration des durch die Reaktion gebildeten Ammoniaks ist offenbar gegeben durch die Formel:
$$C_{NH_3} = C_{M_2} + 2\,C_{M_3},$$
daher ist der zeitliche Verlauf der NH_3-Bildung
$$\frac{d\,C_{NH_3}}{d\,t} = \frac{d\,C_{M_2}}{d\,t} + 2\,\frac{d\,C_{M_3}}{d\,t}.$$

Für eine eingehendere Prüfung dieses Ansatzes reichen die vorliegenden Versuchsdaten noch nicht ganz aus, besonders weil auch noch die Konzentration des Cyanations ermittelt werden muss; es ist aber wünschenswert, dass das experimentelle Material in dieser Hinsicht bald ergänzt wird.

Ich führe schliesslich noch einige Versuche von Lövgren (1921, S. 269) an:

5 ccm 1 mol. Phosphatmischung + 4 ccm 0,25 n. Harnstoff + 1 ccm Enzymlösung. Totalvolumen somit 10 ccm. Temperatur 17°. (Harnstoff-Konzentration 0,1 Mol. per Liter.)

Minuten	NH_3 mg	Max. NH_3 mg	k	a k	pH	c
			E_1			
15	7,21	34,06	69	34	7,0	28
30	13,95	34,06	76	38	7,15	31
45	20,38	34,06	88	44	7,28	38
60	26,47	34,06	109	54	7,41	49
						37
			F_1			
15	8,06	68,12	37	37	7,02	23
30	15,53	68,12	37	37	7,18	24
45	22,21	68,12	38	38	7,31	24
60	28,57	68,12	39	39	7,47	25
			Mittel:	38		24

Zum Teil mögen die steigenden k-Werte mit der Inkonstanz der Acidität (siehe vorletzte Spalte) zusammenhängen.

Die letzte Spalte der beiden Tabellen enthält die Konstante c der Formel von D. D. van Slyke
$$t = \frac{1}{E}\left(\frac{1}{c}\log\frac{a}{a-x} + \frac{x}{d}\right)$$

E = Enzymkonzentration, c = Geschwindigkeit der Enzymbindung,
a = Substratkonz. am Anfang, d = „ „ Substratzersetzung.
a − x = Substratkonz. zur Zeit t,

[Siehe I. Teil, 4. Kapitel, Formel (24).]

Wie im I. Teil ausführlicher besprochen, hat van Slyke, wie früher Adrian Brown, die Annahme gemacht, dass die Bindung zwischen dem Enzym und seinem Substrat eine gewisse messbare Zeit erfordert, welche neben der Zeit der Substratspaltung für den Gesamtverlauf der Reaktion in Betracht kommt. Wir werden aber auch in dem speziellen Fall der Ureasespaltung sehen, dass gegen die von van Slyke vorgeschlagene theoretische Behandlung schwerwiegende Einwände gemacht werden können.

Einfluss der Harnstoffkonzentration.

Zahlreiche ältere Versuche (Marshall, Armstrong und Horton, auch einige Serien von van Slyke und Cullen) sind ohne Puffer und teilweise bei nicht konstantem pH angestellt; bei anderen war die Acidität einigermassen konstant, indem das auftretende Ammoniak während der ganzen Reaktion durch einen CO_2-Strom neutralisiert wurde (Armstrong, Benjamin und Horton); dies entspricht gewissermassen einem Ammoniumcarbonatpuffer.

Berechnet man aus der Tabelle C (S. 33) der letzteren Forscher die Reaktionskonstanten 1. Ordnung k für die Zeit 30 Minuten, so erhält man folgende Werte:

Harnstoff-Konz. a	$k \cdot 10^4$	$a \cdot k \cdot 10^4$
0,2	150	30
0,5	35	17,5
1,0	18	18 (Mittelw.)
2,0	6,5	13
5,0	3	15

Der Reaktionskoeffizient 1. Ordnung k fällt also mit steigender Harnstoffkonzentration. Im vorliegenden Fall ist $a \cdot k$ von der Konzentration $a = 0,5$ an einigermassen konstant[1]. Das Bereich der Konstanz von $a \cdot k$ hängt, wie wir später sehen werden, von der anwesenden Enzymmenge und einigen anderen Umständen ab.

Andere diesbezügliche Versuche ohne Puffer findet man bei van Slyke und Cullen (S. 143 und 144).

Aus der Tabelle S. 143 entnehmen wir:

Harnstoffkonzentration, a in %	1	2	3	4	5	10	20	40
In 15 Min. bei 20° % Harnstoff zersetzt	30,6	15,5	9,6	7,6	6,1	3,0	1,1	0,4
a × % zersetzt Harnstoff	30,6	31	28,8	30,4	30,5	30	22	16

Bei 1—10%igen Harnstofflösungen wäre also auch hier $a \cdot k$ konstant.

Weitere Versuche bei Wester[2] und Lövgren (1921, S. 245).

[1] Die Salzwirkung des Ammoniumcarbonats macht sich hier auch geltend.

[2] Wester, Ber. d. Dtsch. pharm. Ges. 30, 163; 1920.

Grösseres Interesse bieten natürlich die Versuche, bei welchen die Konstanz der Acidität durch Puffer eingehalten und durch pH-Messungen garantiert wurde.

Hier sind zunächst die folgenden Ergebnisse von van Slyke und Cullen (S. 146) anzuführen:

1 ccm Enzymlösung (1 %) + 5 ccm 1 mol. Phosphatmischung + 4 ccm Harnstofflösung wechselnder Konzentration. Gesamtvolumen 10 ccm. Temperatur 20°. Reaktionszeit 60 Minuten. pH etwa 6,8—6,9. E = 0,1.

1	2		3	4		5	6	7	8	
Harnstoffkonz. %	n/100-NH_3		Harnstoffkonzentration Mol. pro Liter	NH_3		$k \cdot 10^4$ $\frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$	$a \cdot k \cdot 10^4$	d	$0,4343\,c = \frac{d}{d\,Et - x} \cdot \log \frac{a}{a-x}$	
	a Max. ccm	x gefund. ccm		a Max. g	x gefund. g				van Slyke	Barendrecht
0,0375	12,5	5,8	0,00625	2,13	0,99	45	0,27		0,055	0,056
0,075	25	10,4	0,0125	4,26	1,77	39	0,49		58	59
0,15	50	15,5	0,025	8,52	2,64	27	0,67		53	54
0,3	100	21,2	0,05	17,03	3,60	17,3	0,86		52	55
0,6	200	24,8	0,1	34,06	4,22	9,6	0,96		51	48
1,2	400	27,0	0,2	68,12	4,59	5,0	1,01		52	39
2,4	800	28,5	0,4	136,24	4,85	2,6	1,04		52	33
4,8	1600	31,0	0,8	272,48	5,27	1,4	1,13	5,17		
9,6	3200	31,0	1,6	544,96	5,27	0,7	1,12	5,17		

Betrachten wir die aus den gemessenen NH_3-Mengen berechneten k-Werte, so sehen wir, dass dieselben auch im Gebiet der kleinsten Harnstoffkonzentrationen nicht konstant sind. Von etwa 0,1 n. Harnstoff an finden wir $a \cdot k \cdot 10^4$ rund 1,0; auf diesen letzten Wert kommen wir noch zurück.

Die drei letzten Spalten der Tabelle beziehen sich auf die Theorie von van Slyke. Zunächst finden wir d angegeben und hierauf (in der vorletzten Spalte) die von van Slyke und Cullen berechneten Werte $0,4343 \cdot c$. Ohne zu wiederholen, was im I. Teil über die van Slykesche Voraussetzung als Grundlage einer allgemeinen Theorie der Enzymreaktionen gesagt wurde, sei hier nur darauf hingewiesen, dass — worauf Barendrecht (Rec. 39, S. 3) aufmerksam machte — der Ausdruck 0,4343 c keineswegs eine gute Konstanz aufweist, sondern schon im Gebiet mässiger Harnstoffkonzentrationen, 0,1 n. bis 0,4 n., bei richtiger Rechnung erheblich fällt.

Aus Messungen von Barendrecht (l. c. S. 45) ersieht man ebenfalls das Konzentrationsgebiet des Harnstoffs, in welchem unter gleichen Umständen in gleichen Zeiten gleiche NH_3-Mengen entwickelt werden. Ich gebe folgenden Auszug:

ccm 0.02 n. NH_3, gebildet in 120 Minuten.

Harnstoff-Konz. %	pH = 6,68	pH = 6,89	pH = 7,14	pH = 7,47	pH = 8,10
0,03	0,58	1,2	1,65	3,2	2,9
0,05	0,90	1,7	2,25	3,45	3,2
0,08	1,3	2,8	2,7	4,05	3,2
0,1	1,6	2,5	3,0	4,15	3,4
0,2	2,3	3,4	3,55	4,65	3,7
0,5	3,3	4,3	4,1	5,0	3,8
1,0	3,9	4,65	4,3	5,05	3,9
2,0	4,45	5,2	4,5	5,15	4,1
4,0	4,8	5,4	4,45	5,25	3,9
6,0	4,85	5,3	4,45	4,45	3,65
8,0	4,8	5,15	4,25	4,60	3,25

Auch hier zeigt sich wie oben das Maximum der NH_3-Entwicklung bei einer Harnstoff-Konzentration von 0,05 n. bis 1 n.

Schliesslich können noch die Versuche 22, 23 und 46 von Lövgren (1921, S. 265, 266 und 284) erwähnt werden. Letzterer Versuch sei mitgeteilt:

1 ccm Enzymlösung + 5 ccm 1 mol. Phosphatmischung. Gesamtvolumen 10 ccm. Temperatur 17°.

Harnstoff-konzentration Mol. pro Liter	Minuten	NH_3 mg	Maximum NH_3 mg	$k \cdot 10^4$	$a\,k \cdot 10^4$	pH Mittel	pH-Optimum
0,0125	4	1,70	4,26	553	35	7,68	7,69
0,025	8	3,53	8,52	290	36	7,62	7,62
0,05	8	3,86	17,03	139	35	7,50	7,55
0,1	8	4,13	34,06	70	35	7,50	7,48
0,2	8	4,24	68,12	35	35	7,39	7,41
0,4	8	4,33	136,24	17,5	35	7,30	7,35
0,8	8	4,40	272,48	8,8	35	7,30	7,27
1,6	8	4,46	545	4,4	35,5	7,20	7,20

Hiernach wäre das Bereich der Konstanten $a \cdot k$ noch grösser als nach van Slykes Messungen; ob die Grenze tatsächlich bis etwa 0,016 n. geht, wird noch weiter zu prüfen sein.

Aus dieser vorläufig angenommenen Zahl würde sich für die Affinitätskonstante K_M der Urease zum Substrat berechnen, wenn [ ] die Konzentrationen bedeuten:

$$K_M = \frac{[\text{Enzym-Substrat}]}{[\text{Enzym}]\ [\text{Substrat}]} = \frac{1}{0{,}008} = 125.$$

Da wir aber über die Mitwirkung des Co-Enzyms und sonstiger Aktivatoren noch nicht genügend unterrichtet sind, sei der genannte Wert mit allem Vorbehalt mitgeteilt.

Die von van Slyke und Zacharias gefundene Tatsache, dass sich das pH-Optimum der Harnstoffspaltung etwas mit der Harnstoffkonzentration verschiebt, ist S. 343 bereits erwähnt worden.

Einfluss der Enzymkonzentration.

Marshall (Jl Biol. Chem. 17, 1913) konnte zuerst[1] zeigen, dass auch bei Urease in gewissen Grenzen die Beziehung gilt: Die zu einem bestimmten Umsatz erforderliche Zeit t ist der Enzymkonzentration [E] der Lösung umgekehrt proportional, also

$$t\,[E] = \text{konst.}$$

Als Beleg sei ein Auszug aus der Tab. 1 von Marshall (S. 353) angeführt:

Enzymkonz. ccm	Minuten	% Harnstoff gespalten	
		10 ccm 1%ige Harnstofflösung	10 ccm 0,5%ige Harnstofflösung
5	16,0	53,3	92,7
4	20,0	53,2	93,1
3	26,0	52,6	94,1
2	40,0	52,0	94,0
1	80,0	51,2	92,9

Den Tabellen IV—VI van Slykes und Cullens entnehme ich die folgenden Zahlen, geltend für 20° und a = 40.

0,03%iges Ureasepräparat

Minuten	a — x	k · 10⁴	0,4343 c (van Slyke)
60	35,80	8,0	0,0527
120	31,60	8,1	0,0557
186	27,90	8,4	0,0520
240	25,16	8,4	0,0500
300	21,92	8,7	0,0503
360	18,90	9,0	0,0513
420	16,80	9,0	0,0513
			d = 4,73

0,3%iges Ureasepräparat

Minuten	a — x	k · 10⁴	0,4343 c (van Slyke)
20	25,92	94	0,0577
30	19,78	102	0,0603
40	14,94	107	0,0600
51	10,80	111	0,0601
60	8,02	116	0,0593
75	4,88	122	0,0586
90	3,10	123	0,0559
			d = 5,12

0,1%iges Ureasepräparat

Minuten	a — x	k · 10⁴	0,4343 c (van Slyke)
30	32,76	29	0,0576
45	29,48	30	49
60	26,72	29	16
90	21,10	31	04
120	16,60	32	16
150	12,46	34	27
180	8,70	37	27
225	5,46	38	50
255	3,66	40	76
			d = 5,17

[1] Proportionalität zwischen Grösse der Ureasewirkung und Bakterienmenge hat 1913 Viehoever [Zbt. Bakt. (II) 39, 209] in Kulturen von Urobakterien gefunden.

Vergleichen wir die für den halben Umsatz gültigen Konstanten ($a - x = 20$), so ergibt sich:

$k \cdot 10^4$	Enzymkonz.	$k \cdot 10^4/E$
8,8	0,03	293
31	0,10	310
100	0,30	333

Weitere Versuche haben Labberté (Pharm. Weekbl. 1915) und Wester (Chem. Weekbl. 13; 1916 und 16, 1442; 1919 — Ber. d. Dtsch. pharm. Ges. 30, 163; 1920) angestellt.

Schliesslich führe ich noch eine Versuchsreihe aus meinem Laboratorium (Lövgren) an.

Phosphat in der Reaktionsmischung 0,2 m. Temperatur 18°.

Reihe	Enzym	Harnstoff-konzentr.	Reaktionszeit Minuten	Max. NH_3 mg	NH_3 mg	pH vor	pH nach	pH Mittel	$\frac{ak}{E}$
A_1	1 ccm E/18	0,00625 m.	27	2,13	0,56	7,68	7,75	7,71	27,6
A_2	1 „ E/6	„	9	2,13	0,59	7,68	7,76	7,72	29,4
A_3	1 „ E/2	„	3	2,13	0,59	7,66	7,74	7,70	29,4
B_1	1 „ E/18	0,05 m.	27	8,52	0,68	7,50	7,57	7,54	29,6
B_2	1 „ E/6	„	9	8,52	0,74	7,50	7,58	7,54	32,4
B_3	1 „ E/2	„	3	8,52	0,72	7,50	7,58	7,54	31,6
C_1	1 „ E/18	0,8 m.	27	272,54	0,87	7,20	7,26	7,23	36,8
C_2	1 „ E/6	„	9	272,54	0,92	7,20	7,27	7,23	39,2
C_3	1 „ E/2	„	3	272,54	0,89	7,20	7,27	7,23	37,8

Enzym: frisch (10:100, 1 Stunde), in A_3, B_3, C_3 unverdünnt, in A_2, B_2, C_2 dreifach verdünnt, in A_1, B_1 C_1 neunfach verdünnt.

Zusammenfassend können wir sagen, dass die vorliegenden Zahlenresultate in einem anscheinend ziemlich grossen Gebiet eine so vollständige Proportionalität zwischen Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit zeigen, als man gegenwärtig, wo die Einflüsse der Salze und Aktivatoren noch nicht genügend aufgeklärt sind, erwarten kann.

Umkehrbarkeit der enzymatischen Harnstoffspaltung.

Nachdem die Ureasewirkung längere Zeit als nicht umkehrbar gegolten hatte[1], war Barendrecht (1920, S. 76) der erste, welcher — auf Grund seiner eigenen verdienstlichen Experimente — die Umkehrbarkeit der enzymatischen Harnstoffbildung erkannt hat: „Diese Versuche zeigen deutlich, dass ein kleiner Teil des Ammoniumcarbonats durch die Wirkung der Urease

[1] Siehe hierzu Bayliss, Brit. Assoc. Repts 85, 687; 1915. — Kiesel, H. 75, 169; 1911. — Jacoby, Biochem. Zs 74, 93 u. zw. 96; 1916.

verschwindet, und dass dieser Teil proportional der Menge der anwesenden Urease ist." Der von Barendrecht beobachtete Effekt war allerdings klein.

Die Kritik, welche gegen den von Barendrecht gezogenen Schluss gerichtet wurde[1], ist durch die späteren Untersuchungen widerlegt worden. Bevor wir das in ureasehaltigen Lösungen eintretende Gleichgewicht betrachten, muss erwähnt werden, dass Lewis und Burrows schon 1912 gezeigt hatten, dass in einer auf 77° erhitzten (natürlich enzymfreien) Lösung von Ammoniumcarbamat oder Harnstoff nach 95 Tagen ein Gleichgewicht statthat, welches 1% Harnstoff neben 99% Carbamat-Carbonat enthält. Neuerdings (1921) ist der Badischen Anilin- und Sodafabrik ein Verfahren patentiert worden, durch welches bei 135—140° unter 15 Atm. Druck in der Ammoniumcarbamatschmelze bis 25% Harnstoff auftreten.

Bei Zimmertemperaturen stellen sich aber die Gleichgewichte ohne Katalysatoren ausserordentlich langsam ein[2], so dass hier ein Einfluss des Enzyms deutlich hervortreten kann.

In zwei Untersuchungen aus dem Jahr 1923 wurde nun, wie es scheint einwandfrei, die Bildung von Harnstoff durch Urease nachgewiesen.

Mack und Villars[3] wiesen die Bildung von Harnstoff durch die Xanthydrol-Reaktion von Fosse nach, durch welche Dixanthyl-Harnstoff als Niederschlag entsteht. Sie untersuchten die Synthese bei 55° (der Optimum-Temperatur für Urease) und bei 25°. Ihre Lösungen enthielten die beiden Ammoniumsalze in folgenden Normalitäten:

	Carbonat	Carbamat	Summe
Lösung II . . .	5,466	4,864	10,330
Lösung III . . .	5,133	6,091	11,224

Damit wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Reaktion bei 55°.

Lösung II			Lösung III		
Stunden	Niederschlag von Dixanthylharnstoff: Keine Urease	0,1% Urease	Stunden	Niederschlag von Dixanthylharnstoff: Keine Urease	1% Urease[4]
0,33	0,0000	0,0000	0,5	0,0000	0,0098
1,5	0,0000	Spuren	1,0	0,0000	0,0340
4,33	0,0000	Spuren	2,0	0,0000	0,0382
27,5	0,0000	0,0164	4,0	0,0000	0,0382
52,0	0,0000	0,0188	7,75	0,0000	0,0768 (?)
98,33	0,0051	0,0314	23,5	Spuren	0,0544
∞ (ber. f. Gleichgewicht)		0,0937	47,0	0,0000	0,0513
			∞ (ber. f. Gleichgewicht)		0,1018

[1] Mattaar, Rec. trav. chim. 39, 495; 1920 und 40, 65; 1921. — Siehe hierzu Barendrecht, Rec. 39, 603 und 40, 66; 1921.

[2] Zum Mechanismus der nichtenzymatischen Harnstoffsynthese siehe auch E. A. Werner, Jl Chem. Soc. 117, 1046; 1920.

[3] Mack und Villars, Jl Amer. Chem. Soc. 45, 501; 1923.

[4] Käufliches Präparat nicht bezeichneter Herkunft.

Reaktion bei 25° (Lösung II).
0,1% Urease

Stunden	1,5	4,5	27,75	98,5	197,25	293,25	∞ (ber. f. Gleichgew.)
mg Dixanthylharnstoff	0,0	0,0	1,6	4,8	10,5	16,2	39,6

In der ureasefreien Lösung trat keine Spur Dixanthylharnstoff auf.

1% eines kräftigen Ureasepräparates stellt somit in einer 10 norm. Ammoniumcarbonat-Carbamat-Lösung, welche etwa gleiche Teile der beiden Salze enthält, bei 55° in etwa 10 Stunden die halbe theoretische Gleichgewichtskonzentration des Harnstoffs her.

Dieses Ergebnis wurde, wenigstens qualitativ, bald darauf durch H. D. Kay[1] bestätigt. Kay konnte Harnstoff gewinnen aus Ammoniumcarbonat-Carbamatlösungen, welche aktive Urease enthielten; dies gelang aber nicht, wenn das Enzym zerstört war, oder in Abwesenheit von Ammoniumcarbonat oder Enzym. Kontrollversuche zeigten, dass Harnstoff auch weder

vom Ammoniumcarbonat-Carbamat allein kommen konnte,
noch von der Urease allein,
noch von der Urease in Gegenwart eines anderen Ammoniumsalzes.

Es erübrigt also für die weitere Forschung nur noch der quantitative Vergleich des nicht enzymatischen und des enzymatischen Gleichgewichtes.

C. Einfluss der Temperatur und Strahlung.

1. Hitzeempfindlichkeit der Urease.

Die ersten Versuche über die Temperaturtoleranz gibt Moll[2] an.

D. D. van Slyke und Cullen (l. c., S. 175) haben einen 1:5 verdünnten Enzymextrakt während 30 Minuten erhitzt und dann 1 ccm 15 Minuten auf 5 ccm 5%ige Harnstofflösung bei der gleichen Temperatur einwirken lassen, während in einem Kontrollversuch die nicht erhitzte Enzymlösung bei der gleichen Temperatur zur Wirkung kam.

ccm 0,02 n. HCl zur Neutralisation des NH_3 verbraucht

Temperatur	Vorher erhitzt	Nicht erhitzt
60°	24,36	24,15
70°	15,74	20,56
80°	0,85	18,8

Aus diesem, allerdings ergänzungsbedürftigen Material würde sich der Inaktivierungskoeffizient $10^4 \cdot k_C$ (siehe Teil I, 6. Kap.) bei 70° zu rund 40 berechnen.

Auf einen grösseren Koeffizienten, etwa $k_C = 125$ könnte man aus einigen von Jacoby und Sugga[3] für die Lösung eines Trockenpräparates angegebenen Zahlen schliessen.

Ein Präparat von hoher Stabilität beschreiben Goris und Costy (C. r. 176, 412).

[1] H. D. Kay, Biochem. Jl 17, 277; 1923.

[2] Moll, Hofm. Beitr. 2, 344; 1902.

[3] Jacoby und Sugga, Biochem. Zs 69, 116; 1915.

Lövgren (1921, S. 250) gibt folgende Versuche an:

4 Kolben mit 1 ccm frischer Enzymlösung + 2 ccm 0,5 m.-Phosphatmischung (pH = 7) + 6 ccm H_2O wurden im Wasserbade 60 Minuten bei verschiedenen Temperaturen gehalten, nach Ende dieser Zeit durch eine Kältemischung rasch bis 17° abgekühlt und mit 1 ccm 1 m.-Harnstofflösung versetzt. Nach 60 Minuten Reaktion bei 17° wurde das Ammoniak nach Folin bestimmt. In allen Kolben entstand während der Erhitzung ein Niederschlag.

Temperatur °C	NH_3 mg	Max. NH_3 mg	k	k Mittel
50,4	12,42	34,06	32,8	32
50,4	12,17	34,06	32,0	
62	11,66	34,06	30,3	30
70	7,36	34,06	17,6	18
70	7,39	34,06	17,7	
80	0,19	34,06	0,4	—
80	0,17	34,06	0,4	—
nicht erhitzt	12,64	34,06	33,5	34
nicht erhitzt	12,85	34,06	34,3	

Daraus berechne ich für 70°

$$10^4 \cdot k_C = 46,$$

was mit van Slykes und Cullens Wert 40 ziemlich gut übereinstimmt; indessen sind eingehendere Versuche wünschenswert, insbesondere um den Einfluss der Temperatur auf die Stabilität des Enzyms und Co-Enzyms festzustellen.

J. Temminck Groll[1] ist auf Grund einer Reihe von Versuchen an Soja-Urease zum Ergebnis gelangt, dass die Wirksamkeit der gelösten Urease nicht nach dem Gesetz für monomolekulare Reaktionen oder nach einem anderen Zeitgesetz abnimmt, sondern dass die Kurve, welche die Abnahme der Wirksamkeit des Enzyms mit der Zeit darstellt, einer Sinusoide gleicht. Bei Versuchen, welche Verf. mit G. Brandting[2] angestellt hat, kam aber ein derartiger Effekt zwischen 17,5° und 50° nicht zum Vorschein.

Durch die einstündigen Erhitzungen auf 45° und 50° wurde die Wirksamkeit etwas (ca. 6%) geschwächt, aber auch bei diesen Temperaturen traten keine anderen Schwankungen ein als diejenigen, die durch die Versuchsfehler bedingt waren.

Nach Goris und Costy[3] soll die Urease aus jungen Pilzen (Boletus edulis u. a.) gegen Erhitzen widerstandsfähiger sein, als Enzym aus alten Pilzen.

Es kann im Zusammenhang mit oben für k_0 erhaltenen Werten von Interesse sein, die Abschwächung zu berechnen, welche Onodera[4] bei

[1] Groll, Kolloid-Zs 21, 138; 1917.
[2] Euler und Brandting, Bioch. Zs 97, 113; 1919.
[3] Goris und Costy, C. r. 176, 412; 1923.
[4] Onodera, Bioch. Jl 9, 544; 1915.

Zimmertemperatur und diffusem Licht in Ureaselösungen (unter Toluol) gemessen hat.

Aus seiner Tabelle (S. 571) entnehme ich:

Aufbewahrung Tage	a — x	$k \cdot 10^4$ (t = Tage)	$k \cdot 10^4$ (Mittel)
0	100	—	t = Minuten
2	97	152	
5	88	256	
13	55	460	0,3
20	41	446	
40	25	346	
52	17	341	

Rechnen wir mit der üblichen Zeiteinheit t = Minuten, so ist der Wert für $k \cdot 10^4 = 0{,}3$. Vergleicht man denselben mit dem bei 70° erhaltenen Wert 45, so fällt der für k_C ungewöhnlich kleine Temperaturkoeffizient auf; mit anderen Worten, es ist wahrscheinlich, dass sich bei dem 52tägigen Versuch noch ein besonderer zerstörender Einfluss, etwa auf das Co-Enzym (das Onoderasche Enzym) geltend gemacht hat. Siehe Onodera, S. 586.

Schliesslich ist von Revoltella[1] untersucht worden, wie sich ein Trockenpräparat der Soja-Urease beim Erhitzen auf höhere Temperaturen verhält; bei 95° wurde das Präparat erheblich geschwächt. Wir geben die Zahlen nicht an, da ja die Stabilität von Enzymtrockenpräparaten in höchstem Grad von den Verunreinigungen, besonders aber von den Spuren Wasser, die sie enthalten, abhängig ist.

Nach Nakagawa wird durch Aminosäuren, Pepton, Serum und Proteine eine Stabilisierung der Urease erreicht[2].

2. Temperaturkoeffizient der Harnstoffspaltung.

Van Slyke und Cullen geben (S. 174) die Versuchszahlen der folgenden Tabelle an:

Enzym: 1 ccm. 5%iger Harnstoff: 5 ccm (250 mg, 0,7 m.). Max. NH_3 = 141,67 mg. Totalvolumen: 6 ccm. 15 Minuten.

Enzymlösung	Temperatur	NH_3 mg
Frisch (1 Teil Sojabohnenmehl + 5 Teile Wasser)	0	1,54
	10	3,64
	20	6,09
Derselbe Extrakt, fünfmal verdünnt	20	1,44
	30	2,52
	40	4,15
	50	6,80
	60	7,24

Daraus berechnet sich eine mittlere Steigerung der Reaktionskonstanten für 10° Temperaturzunahme zwischen 10° und 50° um das (rund) 1,91fache.

[1] Revoltella, Bioch. Zs 134, 336; 1922.
[2] Nakagawa, Mitt. Med. Fak. Tokyo, 28, 383; 1922.

Mit G. Brandting hat der Verfasser[1] den Zuwachs der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen 30° und 40° bestimmt. Es ergaben sich die folgenden relativen Mengen des enzymatisch entwickelten Ammoniaks:

Temperatur	30°	35°	40°
ccm 0,1005 n. H_2SO_4 (Mittel) . .	7,15	10,3	14,15

Für 10° Temperatursteigerung stieg die entwickelte NH_3-Menge zwischen 30° und 40° auf das 1,92fache.

Ein etwas kleineres Verhältnis findet Yamasaki (l. c., S. 113), nämlich 1,81 zwischen 15° und 35°.

Unter Annahme des Wertes 1,9 zwischen 20° und 40° berechnet sich aus der Formel

$$Q = \frac{\log k_2/k_1 \cdot T_1 \cdot T_2 \cdot R}{0{,}4343\ (T_2 - T_1)}$$

$$Q = \text{(rund) } 12000.$$

Einfluss der Strahlung auf die Urease.

An der von Onodera gemessenen Inaktivierung gelöster Urease bei Zimmertemperatur (vgl. S. 367) hat vielleicht auch das diffuse Tageslicht mitgewirkt.

Eine Angabe, dass Urease (wie übrigens die meisten Enzyme) durch langdauernde (50stündige) Belichtung im Sonnenlicht geschwächt wird, macht Wester (Pharm. Zentralhalle 57, 423; 1916).

Pincussen und Kato[2] haben einige orientierende Versuche über den Einfluss des Sonnenlichtes und des ultravioletten Lichtes einer Quecksilberlampe mitgeteilt.

Bei ihren Versuchen war für konstante Temperatur (die Lösungen standen im Wasserbad) und (durch Phosphatpuffer) für konstante Azidität gesorgt. Bezüglich der Strahlung ist nur die Belichtungszeit angegeben.

Quecksilberlicht 2 Stunden. Belichtungstemperatur 22°. Darauf folgende Reaktion bei 40° unter Phosphatzusatz.

pH beim Belichten	Menge des entstandenen NH_3 in mg	
	Belichtet	im Dunkeln
8,2	1,12	1,22
6,7	1,10	1,44
6,1	1,38	1,44
5,6	1,30	1,44

Der beobachtete Effekt war, wie ersichtlich, gering; er ist noch geringer in Gegenwart von Harnstoff, welcher als Lichtschutzstoff wirkt.

[1] Euler und G. Brandting, Bioch. Zs 97, 113; 1919.
[2] Pincussen und N. Kato, Bioch. Zs 134, 470; 1923.

Über Bestrahlung eines Ureasetrockenpräparates mit Sonnenlicht und mit Radiumstrahlen macht Revoltella[1] Mitteilung.

Physiologische Notizen.

1. Urease-Bildung.

Orientierende Versuche über die Bildung von Urease in Bakterien unter verschiedenen Bedingungen haben Jacoby und Mitarbeiter[2] ausgeführt.

2. Toxische Wirkungen.

Subkutane oder intravenöse Injektionen von Bakterienextrakten rufen nach Moll[3], von Soja- oder Robinia-Extrakten oder daraus hergestellten Präparaten nach Marg. Falk[4], Carnot, Gérard[5] und Moissonier[6] sowie Lublin[7] starke physiologische Wirkungen verschiedener Art hervor. Welchen Anteil daran andere, nichtenzymatische Substanzen haben, scheint noch nicht festzustehen.

Marg. Falk[4] gibt die tödliche Dose zu 3 bis 4 ccm Sojaextrakt (1 Teil entfettetes Sojamehl, 5 Teile Wasser) pro g Körpergewicht (Kaninchen) an. Bei intravenöser Injektion treten nach Carnot, Gérard und Moissonier die Erscheinungen der Ammoniakvergiftung ein.

Auch Lublin[8] beobachtete bei weissen Mäusen (nicht bei Kaninchen), und zwar nach subkutaner Injektion, innerhalb 24 Stunden Tod durch Ammoniakvergiftung. Bei Kaninchen stellte er nach intravenöser Urease-injektion Tod durch Embolien fest, vermutlich durch Agglutination der roten Blutkörperchen, welche auch auf Ureasezusatz in vitro auftritt.

Marg. Falk[9] hat ihren Kaninchen Soja-Urease intraperitoneal injiziert und konnte durch Steigerung der injizierten Dosen eine hohe Konzentration der kreisenden Urease im Blut erreichen. Ob im menschlichen Organismus bei Urämie Urease im Organismus auftritt, ist noch zweifelhaft.

Die Urease der Magenschleimhaut studierten Luck und Seth, Biochem. Jl 19.

Hervorzuheben ist hier, dass sich die früheren Angaben von Moll[10] über die Bildung einer Antiurease nach Ureaseinjektion nicht zu bestätigen

---

[1] Revoltella, Bioch. Zs 134, 336; 1923.
[2] Jacoby, Biochem. Zs 81, 332; 1917. — Tetsugora Takahata, Biochem. Zs 140, 147; 1923.
[3] Moll, Hofm. Beitr. 2, 344; 1902.
[4] Marg. Falk, Bioch. Zs 59, 298 und 316; 1914.
[5] Carnot und Gérard, Soc. Biol. 82, 391; 1919. — C. r. 169, 88; 1919.
[6] Carnot, Gérard und Moissonier, Ann. Pasteur, 35, 1; 1921.
[7] A. Lublin, Arch. exp. Path. Pharmak. 92, 280; 1922.
[8] A. Lublin, Bioch. Zs 133, 21; 1922.
[9] Marg. Falk, Bioch. Zs 59, 298 und 316; 1914.
[10] Moll, Hofm. Beitr. 2, 344; 1902.

scheinen. Carnot, Gérard und Moissonier fanden nach intravenöser Einspritzung bei Hunden weder im Serum noch in solchen Organen, welche Urease aufnehmen, eine Antiurease. Dagegen lässt sich nach der intravenösen Injektion die Urease selbst im Serum nachweisen; nach subkutaner Injektion ist der Ureasegehalt im Serum geringer.

D. Praktische Anwendung der Urease und Methoden zur Messung der enzymatischen Harnstoffspaltung.

Die analytische Anwendung der Urease der Sojabohnen zur quantitativen Bestimmung des Harnstoffs im Urin stammt von Marshall[1] (1913). Die Bohnen werden zerrieben und 25 g des Pulvers werden mit 250 ccm Wasser 1 Stunde lang extrahiert. Hierauf werden 25 ccm 0,1 n. HCl hinzugefügt, die Mischung wird bei etwa 35° noch einige Minuten stehen gelassen, wodurch ein grosser Teil der Eiweissstoffe des Extraktes gefällt wird. Die Lösung wird filtriert und mit einigen Tropfen Toluol in einer Stöpselflasche zum Gebrauch aufbewahrt. Die ursprünglich klare Lösung wird bald opaleszent und es entsteht schliesslich ein Niederschlag; die Lösung bleibt aber bei Zimmertemperatur wenigstens 5 Tage lang hinreichend aktiv zum Gebrauch.

Ausführung der Methode, l. c., S. 285 u. ff. Siehe auch D. D. van Slyke, Jl Biol. Chem. 16, 125, u. zw. 128, 1913; mit Cullen 19, 211; 1914. — Fiske, Jl Biol. Chem. 23, 455; 1915.

Die Methode von Marshall hat allgemein günstige Aufnahme gefunden. Zur Ausführung dieser Methode sind jetzt mehrere Ureasepräparate im Handel; indessen dürfte sich die Verwendung eines selbstbereiteten Extraktes aus Sojapulver oder Robiniapulver am meisten empfehlen.

Folin[2] gibt folgendes Verfahren an: In eine 200 ccm Flasche werden ca. 3 g Permutit[3] (bas. Aluminiumsilikat) gegeben; derselbe wird zunächst darin durch Dekantation mit 2%iger Essigsäure und hierauf zweimal mit Wasser ausgewaschen. Zu dem feuchten Permutit werden 100 ccm 30%igen Alkohols, hierauf 5 g Sojabohnenmehl zugegeben und 10 Minuten geschüttelt. Das in 3—4 kleinen Flaschen gesammelte Filtrat ist bei Zimmertemperatur wenigstens 1 Woche, auf Eis 3—5 Wochen haltbar.

Unter den zahlreicheren kleineren Modifikationen der klinisch sehr wertvollen Marshallschen Methode seien noch die Ausführungsformen von Hahn und Saphra[4], von Geselschab (1914) sowie von Deist[5] erwähnt.

[1] Marshall jr., Jl Biol. Chem. 14, 283; 1913. — Siehe auch 15, 487 und 495; 1913.

[2] Folin und Wu, Jl Biol. Chem. 28, 81 u. zw. 92; 1919.

[3] An Stelle von Permutit lässt sich zur Entfernung des Ammoniaks aus dem Urin auch Kieselgur verwenden.

[4] Hahn und Saphra, Dtsch. med. Wochenschr. 40, 430; 1914.

[5] Deist, Klin. Wochenschr. 2, 930; 1923.

Nach vollzogener Harnstoffspaltung wird die Lösung mit Soda oder Pottasche versetzt und das gebildete Ammoniak in der Regel nach der Methode von Folin durch einen Luftstrom in titrierte Säure übergetrieben (siehe Methode S. 372).

Neuerdings hat Wishart[1] vorgeschlagen, das Durchleiten von Luft zur Entfernung des Ammoniaks während der enzymatischen Spaltung vorzunehmen; es soll bei Verwendung von grob gepulverten Sojabohnen möglich sein, die zur Entbindung des Ammoniaks erforderliche Menge Soda zuzusetzen ohne die hydrolytische Wirkung der Urease zu hindern.

Eine Abänderung der Methode von Marshall zur Urinanalyse hat Partos[2] insofern vorgenommen, als er nach Einwirkung der Urease nicht das Ammoniak, sondern die gebildete CO_2-Menge, und zwar volumetrisch, bestimmt.

Methoden zur Messung der enzymatischen Harnstoffspaltung.

Will man in Proben des ureasehaltigen Reaktionsgemisches den Grad der erreichten Spaltung bestimmen, so wird man zunächst die Enzymwirkung durch Zusatz von Alkali oder Säure unterbrechen. Dann kann man messen:

I. Das gebildete Ammoniumkarbonat-Karbamat, und zwar
 1. durch das Ammoniak oder
 2. durch das CO_2 [Jacquemart 1843. — Partos (l. c.)].

II. Den unzersetzten Harnstoff: Ausser älteren Methoden, unter denen diejenige von Liebig (Titration mit Quecksilbernitrat und Soda) und von Mörner und Sjöqvist[3], sowie die Hypobromitmethode genannt seien, muss besonders das Verfahren von Fosse[4] mit Xanthydrol erwähnt werden.

I. Methoden zur Bestimmung des gebildeten Ammoniaks.

Die anscheinend einfachste Methode, die Alkalinität der Lösung selbst mit einer gestellten Säurelösung zu titrieren, ist wenig genau und nicht zu empfehlen.

Nunmehr kommen zu wissenschaftlichen Untersuchungen folgende Arbeitsweisen in Betracht.

a) Der Probe wird überschüssige Säure zugegeben, welche mit Alkali zurücktitriert wird. Das CO_2 haben Armstrong und Horton (1912), sowie Marshall (1914) in der Siedehitze vertrieben, Armstrong, Benjamin und Horton (1913) durch einen Luftstrom. Die Nachteile der Methode liegen besonders darin, dass die Titration durch die in der Lösung vorhandenen Eiweisskörper und anderen Ampholyte sowie durch die anwesenden Salze gestört und undeutlich gemacht wird. Immerhin sind verschiedene brauchbare Ausführungsformen der Methode angegeben worden, z. B. von Hahn[5].

---

[1] G. M. Wishart, Biochem. Jl 17, 403; 1923.

[2] Partos, Bioch. Zs 103, 292; 1920. — Siehe auch Aszódi, Biochem. Zs 128, 391; 1922.

[3] K. A. H. Mörner und J. Sjöqvist, Skand. Arch. f. Physiol. 2, 440; 1890.

[4] Fosse, Ann. Pasteur, 30, 525; 1916.

[5] Hahn, Dtsch. med. Wochenschr. 41, 134; 1915 und 45, 911; 1919. — Siehe auch Hahn und Saphra, l. c.

b) Das Ammoniak wird durch Nesslerisation bestimmt, nachdem die Eiweissstoffe durch Essigsäure gefällt worden sind[1].

c) Das aus der Reaktionsflüssigkeit entfernte Ammoniak wird in eine bekannte vorgelegte Säurelösung übergeführt und zurücktitriert. Hierher gehören die zuverlässigsten Methoden.

In älteren Arbeiten wurde das durch MgO (Kiesel, H. 75) oder Kalk (Zemplén, H. 79) freigemachte Ammoniak abdestilliert oder ohne Zusatz von Basen im Wasserdampfstrom übergetrieben [Armstrong und Mitarbeiter; Jacoby und Schüler; Němec[2]].

Wie Němec betont, ist dabei mit einer teilweisen, allerdings nicht grossen[3] Zersetzung des Harnstoffs während der Destillation zu rechnen.

Das Verfahren c) ist von Folin[4] angegeben: Das Ammoniak wird durch Alkalikarbonat entbunden und durch einen ammoniakfreien Luftstrom in titrierte Säure übergeführt und dann zurücktitriert. (Angewandt in den früher zitierten Arbeiten von Viehoever, Marshall, van Slyke, Barendrecht und Lövgren.)

Modifikationen der Folinschen Methode sind vorgeschlagen von Fiske[5] und Bahlmann[6]. Das Verfahren von Wishard, während der Einwirkung der Urease das NH_3 durch Lüften überzutreiben, ist bereits S. 370 erwähnt.

Zur Anwendung der Folinschen Methodik bei Studien über Ureasewirkung ist aber noch folgendes zu beachten:

1. Wie auf S. 351 betont wurde, verläuft die Harnstoffspaltung in zwei Stufen, nämlich unter Bildung von Ammoniumkarbamat, welches dann in saurer und neutraler Lösung schnell in Ammoniumkarbonat übergeht. In ammoniakalischer Lösung ist NH_4-Karbamat aber beständiger. Was wir eigentlich messen sollen ist, a) die Menge des jeweils angegriffenen Harnstoffs, b) die Menge des enzymatisch gebildeten Ammoniumkarbamates[7].

Bestimmt man nun den Fortschritt der Reaktion durch die nach der Folinschen Methode ermittelte NH_3-Menge, so muss — was bisher in der Regel nicht geschehen ist — genau darauf geachtet werden, dass alles Ammoniumkarbamat in Karbonat übergegangen ist, andernfalls findet man zu wenig Ammoniak.

Es ist von Interesse, in der Reaktionslösung das gebildete Karbaminat und das Karbonat getrennt zu bestimmen. Dazu kann man entweder nach

[1] Folin und Youngburg, Jl Biol. Chem. 38, 111; 1919. — Youngburg, Jl Biol. Chem. 45, 391; 1921. — Grigaut und Guérin, Soc. Biol. 82, 25; 1919.
[2] Němec, Biochem. Zs 91, 126; 1918.
[3] Siehe hierzu Malte Ljungdahl, Soc. biol. 87, 1411 und 1414; 1922.
[4] Folin, H. 37, 161; 1903.
[5] Fiske, Jl Biol. Chem. 23, 455; 1915.
[6] Bahlmann, Ned. Tijdschr. f. Geneesk. 64 (1) 473; 1920.
[7] Über Beziehungen zwischen Ammonium-Carbonat und -Carbamat siehe Wegscheider, Zs anorg. Chem. 121, 110 und Faurholt, ebenda 122, 132 sowie Diss. Kopenhagen 1924.

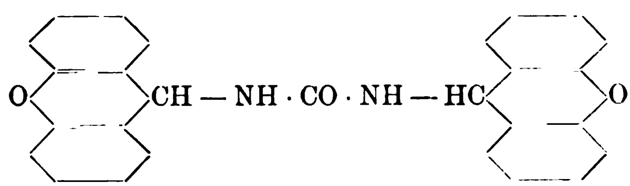
einer von Faurholt[1] angegebenen Methodik das Karbonat als Bariumsalz fällen, ohne dass das Karbaminat dabei mitgefällt wird, oder aber die verschiedene Löslichkeit des Silberkarbonates und Silberkarbaminates benutzen.

2. Wie aus den Untersuchungen von Mack und Villars hervorgeht, ist Ammoniumcyanat ein ständiges Nebenprodukt auch bei der enzymatischen Hydrolyse des Harnstoffs. Für genaue reaktionskinetische Messungen wird es auch notwendig, das gebildete Cyanat zu bestimmen, was am besten durch die Fällung mit Silbernitrat geschieht. Zu beachten ist, dass besondere Massnahmen zur Trennung von Silbercyanat und Silberkarbonat erforderlich sind; nach Fearon[2] (l. c. S. 87) gelingt diese Trennung durch Einstellung der Azidität der Lösung auf pH = 5 mittels Salpetersäure (Methylrot als Indikator).

II. Methoden zur Bestimmung des Harnstoffs.

Zunächst sei an die Mörner-Sjöqvistsche Methode erinnert. Wie A. H. Todd[3] fand, bringt die Abänderung dieser Methode durch Braunstein keinen Vorteil; die ursprüngtiche Vorschrift ist vorzuziehen.

In neuerer Zeit hat Fosse[4] im Xanthydrol einen Körper gefunden, welcher auch den Nachweis sehr kleiner Harnstoffmengen gestattet. Das Reagenz wird hergestellt durch Reduktion von Xanthon mit Natriumamalgam in alkoholischer Lösung und wird dann aus Wasser kristallisiert erhalten. Setzt man eine 10%ige Lösung von Xanthydrol in absolutem Methylalkohol zu einer Harnstoff enthaltenden Lösung, welche mit dem gleichen Volumen Essigsäure versetzt ist, so reagieren 2 Mol. Xanthydrol mit 1 Mol. Harnstoff fast augenblicklich unter Bildung von Dixanthylharnstoff:



Aus reinen und verdünnten Harnstofflösungen setzt sich der Niederschlag von Dixanthylharnstoff kristallisiert und fast analysenrein ab. Nach der Formel liefert Harnstoff beinahe das siebenfache seines Gewichtes an Dixanthylverbindung. Um kleine Harnstoffmengen quantitativ auszufällen, muss man nach Zusatz des Reagenzes mehrere Stunden stehen lassen. Sehr kleine Mengen von Dixanthylharnstoff kann man in Zentrifugierröhrchen messen.

---

[1] Faurholt, Zs anorg. Chem. 120, 85; 1921. — Über die Beziehungen zwischen Ammonium-Carbonat und Ammonium-Carbamat siehe auch Wegscheider, Zs anorg. Chem. 121, 110; 1921 und Faurholt, ebenda 122, 132; 1922.

[2] Fearon, Biochem. Jl 17, 84; 1923.

[3] Alen Herapath Todd, Biochem. Jl 14, 252; 1920.

[4] Fosse, Ann. Pasteur 30, 525, 642 und 739; 1916.

Zur Gewichtsanalyse ist das Fossesche Prinzip neuerdings von Nicloux und Welter[1] ausgearbeitet worden.

Leider ist Xanthydrol sowohl in festem Zustand als gelöst nur begrenzt haltbar.

Besonders wertvoll war das Xanthydrol zum Nachweis der enzymatischen Harnstoffsynthese (Mack und Villars, H. D. Kay).

Kay hat dabei den Umstand benützt, dass Harnstoff, nicht aber Ammoniumkarbonat in Butylalkohol löslich ist, und hat demgemäss den durch enzymatische Synthese gebildeten Harnstoff mit Butylalkohol ausgeschüttelt[2].

Weitere Beiträge zur Analyse:

Gruskin, Jl Lab. Clin. Med. 10, 233; 1924.

Eine Methode zur Bestimmung von Harnstoff in kleinen Blutmengen hat Patterson[3] angegeben.

---

[1] Nicloux und Welter, C. r. 173, 1490; 1921.
[2] H. D. Kay, Biochem. Jl 17, 275 u. zw. 278; 1923.
[3] Patterson, Biochem. Jl 19, 601; 1925.

15. Kapitel.

Amidasen, Arginase und Purinaminasen.

A. Amidasen.

Die biochemische Spaltung der Säureamide und der Abbau der Aminosäuren[1] sind in der Fachliteratur oft zu wenig scharf unterschieden worden. Soviel sich bis jetzt beurteilen lässt sind die Amidasen — früher oft als Desamidasen bezeichnet — mit den Enzymen, welche den Austausch von NH_2 gegen OH in eigentlichen Aminosäuren oder Aminen bewirken, durchaus nicht wesensgleich. Keine der Amidasen reicht an Verbreitung oder biochemischer Bedeutung an die Urease heran. Über die Verbreitung und Spezifität der Amidasen, welche die Amide einbasischer Säuren angreifen, lässt sich bis jetzt noch nichts endgültiges sagen.

Sofern die Säureamidasen, wie Verf. vermutet, reversibel wirkende Enzyme sind, handelt es sich bei der Synthese um eine Dehydratation im Sinne der Gleichung

$$R \cdot COO \cdot NH_4 \rightarrow R \cdot CO \cdot NH_2 + H_2O$$

also um einen noch wenig bekannten Typus enzymatischer Reaktionen.

Immerhin ist es nach den wenigen bis jetzt vorliegenden Tatsachen nicht ausgeschlossen, dass die Synthese der Säureamide einen besonderen Reaktionskomplex ausmacht und durch eine besondere „Amidese“ vermittelt wird.

1. Übersicht über die Substrate.

Untersucht sind in ihrem Verhalten zu tierischen und pflanzlichen Organextrakten

die Amide einbasischer und zweibasischer Carbonsäuren, Acetamid, Benzamid, Oxamid;

monosubstituierte Amide, Acetanilid;

Hippursäure, $C_6H_5 \cdot CO \cdot HN \cdot CH_2 \cdot COOH$, Phenacetursäure, $C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH$;

Benzoylalanin, $C_6H_5 \cdot CO \cdot HN \cdot CH(CH_3) \cdot COOH$;

---

[1] Literatur siehe auch bei Effront, Les Catalisateurs Biochimiques dans la Vie et dans l'Industrie. Paris 1914.

Amide der Aminosäuren, Asparagin und Glutamin, dl-Alaninamid und dl-Leucinamid.

Rein chemisch lassen sich Säureamide sowohl in saurer wie alkalischer Lösung leicht spalten; die Aciditätsverhältnisse sind vom Verf. und E. Rudberg[1] untersucht worden. Ferner kommt noch die Spaltung durch salpetrige Säure in Betracht, welche bei der Amidspaltung verbraucht wird und sich dadurch von reinen Katalysatoren unterscheidet.

2. Amidspaltende Gewebe und Säfte.

Viele ältere Angaben über enzymatische Amidspaltung bedürfen einer kritischen Prüfung; teils ist nicht einwandfrei gezeigt worden, dass es sich um die Hydrolyse eines Säureamides in Ammoniak (bzw. Amin) und freie Säure handelt, teils hat Bakterieninfektion das Vorkommen in manchem Material vorgetäuscht.

Gonnermanns[2] Angabe, dass in tierischen Geweben Amidasen verbreitet sind, scheint sich zu bestätigen[3]. Bergell und Brugsch[4] wiesen Spaltung nach von

dl-Leucinamid durch Presssaft von Kalbsleber, Kalbsniere und Placentabrei.
dl-Alaninamid „ „ „ Kalbsniere und Muskelfleisch.

Spaltung bei subcutaner Injektion in Katzen: C. H. Fiske, Jl Biol. Chem. 55, 191; 1923.

Über die Acetamidspaltung durch Pflanzensäfte ist nichts sicheres bekannt. Nur mit Schimmelpilzen wurde NH_3-Entwicklung erzielt (Dox[5], Shibata[6]).

Um zu zeigen, wie schwach die beobachteten Wirkungen waren, seien folgende Ergebnisse von Dox wiedergegeben:

Substrat, 0,2 g	Spaltungsdauer Tage	mg N entw. als NH_3
Harnstoff	4	17,4
Asparagin	4	14,4
Biuret	5	0,6
Acetanilid	5	0,0
Alanin	5	1,5
Benzamid	5	2,1

Was die Spaltung von Acetamid und seiner Homologen durch pflanzliche Gewebe und Säfte betrifft, so sind spezifische Enzymwirkungen noch unsicher; insbesondere bedürfen die gelegentlich erhobenen positiven Befunde an Hefe noch einer weiteren Prüfung.

---

[1] Euler und Rudberg, Zs anorg. Chem. 127, 244; 1923.
[2] Gonnermann, Pflüg. Arch. 89, 493; 1902. — 95, 278; 1903.
[3] Keine „Desamidase" in Hypophysen: Buetow, Biochem. Zs 54, 40; 1913.
[4] Bergell und Brugsch, H. 67, 97; 1910.
[5] A. W. Dox, Jl Biol. Chem. 6, 461; 1909.
[6] Shibata, Hofm. Beitr. 5, 385; 1904.

Synthese.

Besondere Aufmerksamkeit verdient die vom enzymatischen Standpunkt aus noch wenig studierte biochemische Bildung der Säureamide, und zwar nicht nur des Asparagins (siehe unten), sondern des Milchsäureamids, des Bernsteinsäureamids u. a. nach der Gleichung

$$R\cdot COO\cdot NH_4 \rightarrow R\cdot COO\cdot NH_2 + H_2O.$$

Zur Methodik.

In der Regel Bestimmung des entwickelten Ammoniaks (vgl. S. 371 u. ff.).

Bergell und Brugsch (H. 67) fällen die unveränderten Substrate Leucinamid und Alaninamid mit β-Naphtalinsulfochlorid als Naphtalinsulfoverbindungen.

Unter den in Betracht kommenden Substraten sind ohne Zweifel das Asparagin, sein Homologes, das Glutamin und die Hippursäure die biologisch interessantesten. Ob die wirksamen Gewebe und Säfte eine besondere „Asparaginase" enthalten kann noch nicht als ganz entschieden angesehen werden; wahrscheinlicher ist die Existenz eines Hippursäure-Enzyms. Bei der Asparaginase handelt es sich also einstweilen nur um eine vorläufige Bezeichnung, unter welcher das Tatsachenmaterial zusammengefasst wird.

3. Asparaginase.

Die hier zu besprechende Reaktion ist also die Spaltung des Asparagins in Asparaginsäure und Ammoniak.

$$\begin{matrix} H_2N\cdot CH\cdot COOH \\ CH_2\cdot CONH_2 \end{matrix} \rightarrow \begin{matrix} H_2N\cdot CH\cdot COOH \\ CH_2\cdot COOH \end{matrix} + NH_3$$

Die weitere Umwandlung der Asparaginsäure in Äpfelsäure und NH_3 wird im nächsten Kapitel behandelt.

Säfte und Gewebe, welche Asparagin spalten.

Die ersten eingehenderen Angaben über die Verbreitung einer evtl. „Asparaginase" machte v. Fürth[1], welcher mit den Versuchstieren Schwein und Pferd fand, dass „eine Asparaginspaltung niemals vermisst wurde, sich vielmehr in allen Organen, und zwar in einem Ausmass vollzieht, dass keinem derselben die überragende Ausnahmestellung eingeräumt werden kann". Auch Clementi[2] spricht sich auf Grund eigener systematischer Versuche für eine ziemlich weite aber nicht allgemeine Verbreitung der „Asparaginase" aus; er fand sie, und zwar besonders in der Leber, bei den Omnivoren Schwein und Ratte, nicht bei Menschen und Affen, ferner unter den Pflanzenfressern beim Meerschweinchen (im Serum), ferner bei Vögeln (in Leber und Niere). Bei Carnivoren soll sie fehlen, auch nach Asparaginfütterung nicht auftreten.

[1] v. Fürth und M. Friedmann, Biochem. Zs 26, 435; 1910.
[2] Clementi, Arch. Intern. Physiol. 19, 369 u. zw. 395; 1922.

Dass „Trypsin“ keine „Asparaginase“ enthält, betont Schwarzschild[1]. In den Spaltproduktion der tryptischen Verdauung des Caseins bleiben Amide, wohl besonders Glutamin, zurück; sie können direkte Spaltprodukte des Caseins sein, aber nach Luck[2] ist die Wirkung einer sekundären enzymatischen Synthese nicht ausgeschlossen.

Bei Pflanzen fand Kiesel[3] Asparaginspaltung durch den Saft (nicht durch die alkoholgefällten Präparate) von Vicia sativa und Lupinus albus (4-wöchige Keimpflanzen).

Nach zuverlässigen Versuchen von Dieter[4] wird die Amidgruppe des Asparagins weder durch gärende noch durch nichtgärende Hefen (sofern diese nicht wachsen) abgespalten; demgegenüber muss gefragt werden, ob die gegenteiligen Befunde von Effront[5] und von O. v. Fürth und Friedmann[6] an autolysierter Brauereihefe und an Sakéhefe (Kurono[7]) nicht durch Infektionen beeinflusst sind.

Schimmelpilze greifen Asparagin an (Dox[8], vgl. Tab. S. 376; Shibata), ebenso viele Bakterien (Nawiasky; S. A. Waksman, Jl Agric. Res. 30; 1925).

Darstellung. Im Autolysesaft tierischer und pflanzlicher Organe kommt die enzymatische Hydrolyse, wie erwähnt, zur Wirkung. Kurono gibt an, aus Hefesaft durch Fällung mit Alkohol ein aktives Präparat erhalten zu haben (ob der Saft bakterienfrei war lässt sich nicht beurteilen). Clementi fällt tierisches Enzym mit Aceton.

Wirkungsbedingungen: Nach Clementi (Arch. int. 19, S. 394) liegt das Optimum bei neutraler oder ganz schwach alkalischer Reaktionen; pH-Messungen wünschenswert.

Synthese: Eventuelle synthetische Wirkungen einer Asparaginase verdienen noch weitere Erforschung, besonders in Rücksicht auf die interessanten Ergebnisse von Prjanischnikow[9], seiner Schüler und Mitarbeiter, besonders Smirnow[10], G. G. Petrow und J. Schulow, über die Beziehungen zwischen Asparagin und Harnstoff. — Asparagin aus Eiweiss: Borodin (1878); Schulze; Butkewitsch; Chibnall (Biochem. Jl 18; 1924).

Methodik: Von Clementi u. a. wurde mit Vorteil die Formoltitration benützt.

---

[1] Schwarzschild, Hofm. Beitr. 4, 34; 1903.
[2] Luck, Biochem. Jl. 18, 679; 1924.
[3] Kiesel, H. 60, 476; 1909.
[4] Dieter, H. 120, 281; 1922.
[5] Effront, C. r. 146, 779; 1908.
[6] v. Fürth und Friedmann, Biochem. Zs 26, 435; 1910.
[7] K. Kurono, Coll. Agric. Tokyo 1, Nr. 3, 295; 1911.
[8] Dox, Jl Biol. Chem. 6, 461; 1910.
[9] Prjanischnikow, Biochem. Zs 150, 407; 1924. — Siehe auch Rev. gén. de Bot. 25, 5; 1913.
[10] Smirnow, Biochem. Zs 137, 1; 1923.

4. Hippuricase (Histozym).

Die Spaltung der Hippursäure in Benzoesäure und Glykokoll durch einen Bestandteil der Nieren des Schweines wurde bekanntlich durch Schmiedeberg[1] entdeckt, von dem auch die Bezeichnung Histozym stammt. Smorodinzew[2] schlug den Namen Aminoacylase vor, Clementi[3] neuerdings den hier gewählten, Hippuricase.

Substrate.

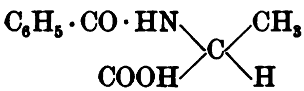
Hippursäure (rhomb. Krist. Schmpt. 187,5) kommt bekanntlich im Harn von Pflanzenfressern vor[4].

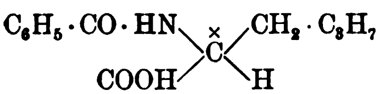
Die Spaltungsfähigkeit ist nicht auf Benzoylglykokoll beschränkt, sondern erstreckt sich nach Smorodinzew[2] auch auf Homologe, und zwar der α-Aminosäuren, z. B. auf die d-α-Benzoylaminobuttersäure, und zwar sind diese Spaltungen asymmetrisch. Ferner auf Glykocholsäure und Taurocholsäure.

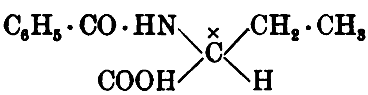
Neuberg und Linhardt[5] haben hierauf eine Methode zur Zerlegung racemischer Aminosäuren gegründet (Versuch mit Benzoylalanin).

Hippuricase (Smorodinzew)

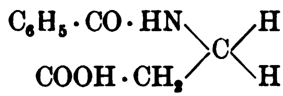
spaltet

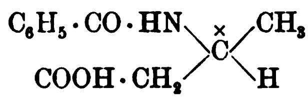

α-Benzoylalanin

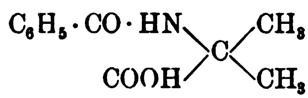

l-Benzoylleucin

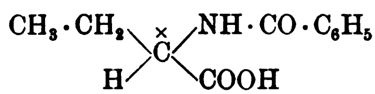

d-α-Benzoylaminobuttersäure

spaltet nicht


β-Benzoylalanin


β-Benzoylaminobuttersäure


Benzoylaminoisobuttersäure


l-α-Benzoylaminobuttersäure

Die von Neuberg[6] gefundene Spaltung der Phenacetursäure (Phenylessigsäureglykokoll) durch Takadiastase ist wohl der Hippuricase zuzuschreiben.

---

[1] Schmiedeberg, Arch. exp. Path. 14, 288 u. 379; 1881.

[2] Smorodinzew, H. 124, 123; 1922.

[3] Clementi, Atti Lincei (5) 32 II, 172; 1923.

[4] Auch der Mensch scheidet nach Eingabe von 5 g Benzoesäure 5 g Hippursäure im Harn aus. Harn aus normalen Nieren kann bis zu 2% Hippursäure enthalten. Snapper, Klin. Woch. 3, 55; 1924.

[5] Neuberg und Linhard, Biochem. Zs 147, 372; 1924. — Hoppert, Biochem. Zs 149, 510; 1924.

[6] Neuberg und Noguchi, Biochem. Zs 147, 370; 1924.

Verbreitung der Hippuricase.

Während sich nach Jacoby[1] das Enzym in allen Organen der untersuchten Tiere finden soll, ist es nach Smorodinzew[2] und Clementi (1923) u. a. bei Schwein (grosse Mengen), Hund, Pferd und Ratte in der Niere konzentriert, findet sich beim Schwein aber auch in der Leber, ferner im Skelettmuskel des Hundes[2].

Synthese: Widmark und Jensen-Carlen, C. r. Soc. Biol. 90, 1185; 1924. Verminderte Synthese bei Skorbut (A. Palladin, 1925).

Über das Vorkommen in höheren Pflanzen finden sich keine Angaben.

In Schimmelpilzen (Dauerpräparate) fanden Shibata und besonders Dox (l. c.) Hippuricase[3]; die Angaben von Kossowicz[4] über die Zersetzung von Hippursäure durch eine Anzahl von lebenden Pilzen unter Ammoniakbildung lassen sich enzymchemisch nicht verwerten. In Takadiastase wiesen Neuberg und Noguchi (1924) wie erwähnt, Spaltung der Phenacetursäure nach.

Angaben über die Spaltung durch Bakterien bei van Tieghem (1864), Y. Seo[5] und in der „Mikrobiologie" von V. Kruse. Dass die Hippuricase von Erepsin verschieden ist, wird neuerdings wieder von Clementi (l. c. 32) betont, denn weder Pankreas noch Darmsaft spalten Hippursäure.

Wirkungsweise.

Nach Mutch[6] verläuft die Hippursäurespaltung bis zum Eintritt eines Gleichgewichts. Mutch fand bei seinen Versuchen 97% Spaltung. Eine seiner kinetischen Versuchsreihen sei angeführt, um eine Vorstellung von der Wirksamkeit der enzymreichsten Gewebe zu geben.

20 ccm Na-Hippurat, enthaltend 0,28 g Hippursäure + 0,8 g Nierenextrakt + 5 ccm Toluol.

Inkubationsdauer Stunden	mg Benzoesäure gefunden	% Hippursäure hydrolysiert
11	10	7
17	14,7	10
36	31	21
60	45	30
82	69,5	46
106	83,2	55
157	118,7	79
208	140,5	94
255	147,2	97
399	146,5	97

Natriumbenzoat hemmt.

Die im Gleichgewicht vorhandene kleine unzersetzte Hippursäuremenge

[1] M. Jacoby, H. 30, 148; 1900.
[2] Smorodinzew, H. 124, 123; 1922.
[3] Siehe auch Dox und Neidig, H. 85, 68; 1913.
[4] Kossowicz, Js. Gärungsphys. 1, 60; 121, 317; 1912. — 2, 51, 81; 1913.
[5] Y. Seo, Arch. exp. Path. 58, 440; 1908.
[6] Mutch, Jl of Physiol. 44, 176; 1912.

soll nach Mutch und auch nach Abelous und Ribaut[1] (durch Brei von Pferdenieren) enzymatisch synthetisiert werden können. Effekt allerdings gering.

Wirkungsoptimum scheint bei etwa pH = 7 zu liegen.

Methodik.

1. Bestimmung der Benzoesäure: Die Benzoesäure wird aus der Reaktionsmischung abdestilliert und im Destillat titriert (Pfeiffer, Block und Riehe 1902, sowie Wiechowski[2]).

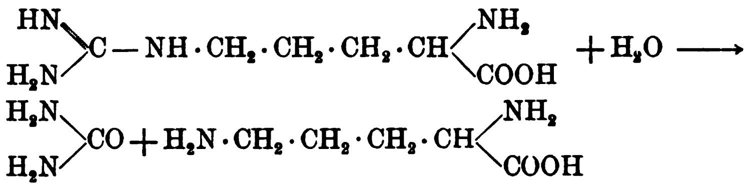
2. Bestimmung des Glykokolls: Formoltitration nach Sörensen (Clementi) oder nach Fischer[3] mit Naphthalinsulfochlorid oder nach Neuberg und Manasse[4] mit Naphthylisocyanat.

3. Bestimmung der Hippursäure: Colorimetrisch nach Mutch, l. c.

B. Arginase.

1. Substrat.

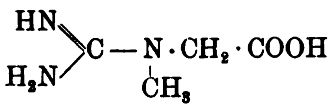
An die Amidasen kann die von Kossel und Dakin[5] entdeckte und besonders im Kosselschen Laboratorium studierte Arginase angereiht werden, deren spezifische Reaktion in der Hydrolyse des d-Arginins besteht:



Harnstoff Ornithin

Diese Spaltung wird auch durch Alkali erreicht[6].

Andere Substrate sind untersucht worden: Kreatin[7] und Guanidin[8]



Kreatin

(Guanidininessigsäure, Guanidylcapronsäure), sowie l-Arginin, ferner Clupeon-Diarginylpeptid (Felix und Morinaka, H. 132) werden nicht angegriffen, wohl aber nach Thomas[9] γ-Guanidylbuttersäure, welche durch Leberpresssaft in Harnstoff und γ-Aminobuttersäure zerlegt wird.

[1] Abelous und Ribaut, Soc. Biol. 52, 543; 1900.
[2] Wiechowski, Hofm. Beitr. 7, 204; 1906.
[3] Fischer und Bergell, Chem. Ber. 35, 3779; 1902. — F. Aminosäuren S. 796.
[4] Neuberg und Manasse, Chem. Ber. 38, 2359; 1905.
[5] Kossel und Dakin, H. 41, 321; 1904 und 42, 181; 1904.
[6] Kossel und Weiss, H. 59, 492; 1909.
[7] Bierry und Ranc, Soc. Biol. 67, 184; 1909.
[8] A. Clementi, Lincei (5) 30; 1921. — 31, 454, 559; 1922. — Clementi, Arch. di Fisiol. 21; 1923.
[9] Thomas, H. 88, 465; 1913. — Arginin im Protein: Sakaguchi, Jl of Biochem. 5; 1923.

An racemischem Arginin beobachtete Riesser[1] asymmetrische Spaltung (der d-Komponente), dagegen fanden Felix und Morinaka[2] eine totale Hydrolyse bei Durchströmung der Leber.

Im Arginylarginin wird nur der eine Argininrest abgebaut, und zwar derjenige, welcher die freie Carboxylgruppe trägt (Edlbacher).

2. Vorkommen der Arginase.

In Säugetieren ist die Leber[3; 7] dasjenige Organ, in welchem die Arginase stets und in verhältnismässig reichlicher Menge vorkommt. Die früheren Angaben über die Verbreitung der Arginase in anderen Organen (Niere[4], Thymus[4], Darmschleimhaut[4] usw.[5]) werden durch die methodisch zuverlässigeren Versuche, die Edlbacher in Kossels Institut angestellt hat, nicht bestätigt. Nach Edlbachers[6] Angaben fehlt Arginase (ausser bei weiblichen Enten und Hühnern) bei Vögeln in der Leber. Letzterer Befund wird durch Felix und Tomita (l. c.) bestätigt. Auch Milz, Gehirn und Serum von Katzen fand Edlbacher frei von Arginase.

Nach Clementi wäre allerdings eine noch weitere Verbreitung der Arginase in der Tierwelt, auch bei Vögeln und bei Avertebraten anzunehmen[7].

Neuerdings kommt Edlbacher[8] zu folgenden Ergebnissen:

Die Arginase lässt sich nicht nachweisen in der Darmschleimhaut von Hund, Katze und Taube.

Beim Huhn unterscheiden sich männliche und weibliche Tiere, indem erstere in der Leber reichliche Mengen Arginase enthalten, letztere meistenteils nicht. Es wird dadurch eine grundsätzliche Verschiedenheit zwischen männlichem und weiblichem Argininstoffwechsel bewiesen. Die Hoden von Hähnen, Taubern, Stieren, Hunden und Meerschweinchen enthalten in Übereinstimmung damit reichliche Mengen von Arginase, Kälberhoden dagegen nur wenig; dies weist auf die Funktion dieses Organs vor und nach der Pubertät hin.

In den meisten Ovarien von Hühnern, Tauben und Hunden lassen sich nur ganz geringe Mengen von Arginase nachweisen.

In den Nieren von Hund, Katze, Kaninchen, Maus, Meerschweinchen findet sich in den meisten Fällen Arginase; Wirksamkeit dieser Organextrakte jedoch schwankend.

In der Milz von Hund, Katze, Maus, Kaninchen, Meerschweinchen, Huhn

---

[1] Riesser, H. 49, 210; 1906.

[2] Felix und Morinaka, H. 132, 152; 1923. — Felix und Tomita, H. 128, 40; 1922.

[3] Berthold Fuchs, H. 101, 114; 1921. — Sowohl in gesunden wie in pathologischen menschlichen Lebern, sowie in Carcinom-Metastasen der Leber kommt Arginase reichlich vor.

[4] Kossel und Dakin. H. 41, 321; 1904 und 42, 181; 1904.

[5] Mihara fand Arginase im Stierhoden, H. 75, 443; 1911.

[6] Edlbacher, H. 95, 81; 1915. — 100, 111; 1917. — 145, 69; 1925.

[7] Clementi, Lincei (5) 23; 1914. — Fisiol. 13, 189; 1915 u. 14, 207; 1916. — Arch. di Farm. 26, 84; 1921.

[8] Edlbacher und Bonem, H. 145, 69; 1925.

und Taube fand Edlbacher keine Arginase, auch nicht in den Nebennieren des Meerschweinchens. Nach Sendju[1] enthalten Hühner-Nieren Arginase. Ferner Organe von Amphibien, Reptilien und Fischen.

In der Pflanzenwelt ist die Verbreitung der Arginase auf Veranlassung Kossels von Kiesel[2] studiert worden, und zwar wurde das Enzym gefunden im Mutterkorn, in Keimlingen von Vicia sativa, in grünen Keimpflanzen von Trifolium pratense und in reifen Früchten von Angelica silvestris.

Was die Argininspaltung durch die Hefe betrifft, so scheint die Angabe von Shiga[3] nach den negativen Befunden von Edlbacher recht zweifelhaft. Bakterien wurden mit Edlbachers Methodik von Hino[4] sowie (Methodik S. 384) von Kossel u. Mitarb.[4] untersucht, welche Spaltung von d-Arginin durch lebende Bac. pyocyaneus und Bac. fluorescens, sowie durch ihre Aceton-Trockenpräparate fanden (letztere spalten wahrscheinlich auch l-Arginin). Mit zahlreichen anderen Bazillenleibern (Bac. coli, Streptokokken u. a.) konnte Arginin nicht gespalten werden. Penicillium scheint neben Arginase noch andere verwandte Enzyme zu enthalten. Aspergillus oryzae enthält Arginase (Sendju).

3. Darstellung und Reinigung von Arginase-Präparaten.

Edlbacher stellte ein Arginase-Pulver in folgender Weise her (H. 100):

500 g ganz frische Kalbsleber wurden in der Hackmaschine zerkleinert, mit Kieselgur gut verrieben und in der Buchnerschen Presse bei 300 Atmosphären ausgepresst. Man erhielt 200 ccm klaren Presssaft, der unter heftigem Umrühren in dünnem Strahl in zwei Liter Aceton gegossen wurde. Das Ausgeschiedene wurde abgesaugt, mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet.

4. Wirkungsbedingungen.

Aciditätsoptimum der Arginase (aus Rattenleber) liegt nach Hunter und Dauphinee[5] bei pH = 9,8 (nicht nach Hunter und Morell[6] bei pH = 7,0). In naher Übereinstimmung hiermit finden Edlbacher und Bonem[7] das Optimum für 26° und 38° bei pH = 9,5—9,8. Dabei ist der Abbau des Arginins fast vollständig. (In Hunters Arbeit findet man Angaben über den Einfluss der Temperatur.) Die von Edlbacher früher beobachtete Aktivierung durch Natriumphosphat ist vielleicht auf die Annäherung an die Optimalacidität zurückzuführen. Mit Calciumsalzen (in $^1/_{15}$ n-Lösung) wurde eine erhebliche Hemmung der Enzymwirkung erzielt.

[1] Sendju, Jl of Biochem. 5, 229; 1925.
[2] Kiesel, H. 60, 460; 1909. — 118, 267; 1922.
[3] Shiga, H. 42, 502; 1904.
[4] Hino, H. 133, 100; 1924. — Kossel und F. Curtius, H. 148, 283; 1925.
[5] Hunter und Dauphinee, Proc. R. Soc. B. 97, 209; 1924.
[6] Hunter und Morell, Trans. Proc. R. Soc. Canada (III) 16, 75; 1922.
[7] Edlbacher und Bonem, H. 145, 69; 1925.

Die Kinetik der monomolekular verlaufenden Arginasespaltung bei pH = 6,62 hat Eberh. Gross[1] untersucht. Der zeitliche Verlauf folgt bei pH = 6,6 nicht einer Reaktionsgleichung 1. Ordnung. Bei dieser Acidität geht die enzymatische Spaltung nach Gross nicht zu Ende, sondern bleibt bei 70—85 % Abbau stehen. Von den beiden Spaltungsprodukten hemmt nur Ornithin, diese Hemmung wird allerdings durch Harnstoffzusatz noch verstärkt.

Zur Spezifität der Arginasen findet man ausser den bereits zitierten Angaben solche von Dakin[2], Kossel[3], Gottlieb[4] u. a.

Besonders verdient noch die Zerlegung des Kreatins weitere Aufmerksamkeit. Dass es sich aber kaum um ein Enzym im Sinne von Gottlieb und Stangassinger handelt, dürfte durch die Arbeiten von Hammett[5] sowie von Hahn[6] und Barkan nachgewiesen sein.

5. Methodik.

Der älteren Methodik von Kossel und Dakin ist die Formoltitration zur Messung des Reaktionsverlaufes vorzuziehen (Clementi; Edlbacher). Da im Arginin nur das α-N-Atom formoltitrierbar ist und der gebildete Harnstoff keinen formoltitrierbaren Stickstoff besitzt, wohl aber im Ornithin beide Aminogruppen mit Formol reagieren, so steigt offenbar bei der Spaltung der formoltitrierbare Stickstoff auf das doppelte.

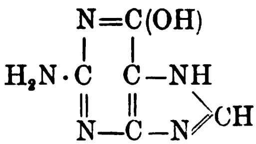
Hunter und Dauphinee (l. c.) haben 1924 eine neue Methode vorgeschlagen: Die Spaltung von Arginin in Ornithin und Harnstoff wird so ermittelt, dass der gebildete Harnstoff mit Urease als Ammoniumcarbonat bestimmt wird. Diese Methode hat neuerdings auch Edlbacher benützt; während sich mit der Formoltitration Arginase in den Nieren der Vögel nicht nachweisen liess, wurden mit der Urease-Methode reichliche Mengen von Arginase (bzw. gebildetem Harnstoff) gefunden.

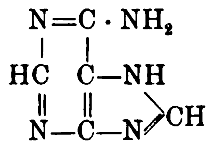
Kossel, E. Gross (H. 135) und F. Curtius fällen Arginin als Flavianat.

C. Purin-Aminasen.

Substrate.

Die hier in Betracht kommenden Amine sind:





Guanin und Adenin

[1] Eberh. Gross, H. 112, 236; 1921.
[2] Dakin, Jl Biol. Chem. 3, 435; 1908.
[3] Kossel und Mitarb., H. 72, 486; 1911. — 76, 457; 1911. — 78, 402; 1912. — 84, 1; 1913.
[4] Gottlieb und Stangassinger, H. 52, 1; 1907.
[5] Hammett, Jl Biol. Chem. 48, 133 u. 53, 323; 1923.
[6] A. Hahn und G. Barkan, Zs Biol. 72, 25; 305. — A. Hahn und Georg Meyer, Zs Biol. 76, 247. — 78, 91; 1923.

welche in die entsprechende Oxy-Purine übergehen:



Xanthin und Hypoxanthin

Ob ausserdem noch Cytosin in Uracil desamidiert wird, ist noch unsicher[1].

An diese Stufe des Purinstoffwechsels schliesst sich dann in der Regel die weitere Oxydation zur Harnsäure an, welche den Purin-Oxydasen zugeschrieben wird.

Ausserdem wurden noch für die entsprechenden Purin-Riboside Guanosin und Adenosin (siehe S. 329) besondere Enzyme angenommen.

Man muss sagen, dass über den Reaktionsmechanismus dieser Amino-Purindesamidierungen noch wenig bekannt ist; man weiss nicht einmal, ob es sich wirklich um reine hydrolytische Katalysen handelt, oder ob nicht Oxydo-Reduktionsmittel dabei verbraucht werden.

Verbreitung der Purin-Aminasen.

Ob die beiden desamidierenden Wirkungen, welche gewisse Organbreie auf Guanin bzw. auf Adenin ausüben und welche besonders durch Schittenhelm und Jones eingehend studiert wurden, einem einzigen oder zwei Enzymen zuzuschreiben sind, lässt sich noch nicht entscheiden. Es ist nach neueren enzymchemischen Erfahrungen wahrscheinlich, dass die Verschiedenheit der Begleitsubstanzen aus verschiedenem Material Differenzen zwischen einer „Guanase“ und einer „Adenase“ nur vortäuscht.

Schittenhelm schreibt darüber in Oppenheimers Handbuch IV, 1:

„. . . So stellt sich die bemerkenswerte Tatsache heraus, dass man bei Verwendung von Rinder- und Pferdeorganen in den Extrakten stets die Umsetzung von Guanin und Adenin in gleich intensivem Grade erweisen kann; bei Verwendung von bestimmten Organen des Menschen, des Schweines, des Hundes und des Kaninchens dagegen geht die Umsetzung häufig scheinbar nur für den einen Körper; so vermag Menschenmuskel und Menschenleber, Kaninchen- und Hundeleber nur Guanin, Schweineleber und Schweinemilz nur Adenin umzusetzen . . . . Jones hat deshalb zwei verschiedene Fermente angenommen, eine Guanase und eine Adenase (W. Jones und Partridge, H. 42, 343; 1904. — W. Jones und Winternitz, H. 44, 1; 1905). Schittenhelm hat dann gezeigt, dass die Unterschiede häufig nur quantitative sind . . .“

Jedenfalls wurde die Desamidierung der Guanase mit vielerlei Material beobachtet und durch Organbreie viel häufiger nachgewiesen als diejenige der Adenase.

[1] Siehe Hahn und Lintzel, Zs Biol. 79, 179; 1923.

Vorkommen		Autor und Schriftstelle
Guanase	Adenase	
Nicht oder wenig in Leber und Milz des Schweines	—	Jones, H. 45, 85; 1905. — 48, 110 1906. — Biol. Chem. 3, 227; 1907. — Schittenhelm u. Schmidt, Zs exp. Path. 4, 432; 1907.
Nachgewiesen in menschl. Leber, Muskel, Lunge	Wenig in menschl. Organen. Fehlt in Milz	Schittenhelm u. Schmidt, Zs exp. Path. 4, 424; 1907 u. H. 63, 248; 1909.
—	Fehlt in menschl. Organen	Jones u. Winternitz, H. 60, 180; 1909.
—	Fehlt in menschl. Organen	E. R. Long, Biol. Chem. 15, 449; 1913.
Menschl. Tumoren	Fehlt in menschl. Tumoren	Wells u. E. R. Long, Zs Krebsf. 12, 1913.
Fehlt in Schweine-Embryo	Gefunden in Leber vom Schweine-Embryo	Mendel, Am. Jl Physiol. 20, 97; 1907.
—	Hund, versch. Organe, fehlt	Amberg u. Jones H. 73, 407, 1911.
—	Hund, Leber u. Darm wenig	Frätznick, Diss. Erlangen 1912.
Lupinen-Keimlinge	—	Schittenhelm, H. 63, 289; 1909.
Hefe	Fehlt in Hefe	Straughn u. Jones Biol. Chem. 6, 245, 1909.
Nicht in Hefepulver	—	Amberg u. Jones, Biol Chem. 13, 441. 1912.

Wegen der Frage nach der Existenz spezifischer Nucleosid-Aminasen und betr. ihres Vorkommens muss auf die Original-Arbeiten von Schittenhelm[1], Jones[2] und ihrer Mitarbeiter verwiesen werden.

Methodik: Unter Hinweis auf die eben zitierten Arbeiten sowie auf Mendel und Mitchel (Am. Jl Physiol. 20, 97, und zwar 101) muss auf die langen Versuchszeiten (bis zwei Monate) hingewiesen werden, welche oft zur Anwendung kamen.

D. Die biologische Spaltung der Aminosäuren.

Der einfachsten chemischen Formulierung nach würde beim Übergang einer Aminosäure in die entsprechende Oxysäure eine eigentliche Hydrolyse vorliegen.

$$H_2N\cdot CH_2\cdot COOH + H_2O \rightarrow HO\cdot CH_2\cdot COOH + NH_3\cdot$$

Tatsächlich ist eine enzymatische Katalyse in diesem Sinne auch angenommen worden, und zwar von Ahlgren[3], welcher mit Versuchen über die Desaminierung der Asparaginsäure durch Froschmuskulatur an diese Frage

[1] Schittenhelm und Wiener, H. 77, 77; 1912.
[2] V. N. Leonard und Jones, Biol. Chem. 6, 453; 1909. — Jones, H. 65, 383; 1910. Vögtlin und Jones, H. 66, 250; 1910. — Jones, Biol. Chem. 9, 129 u. 169; 1911.
[3] Ahlgren, C. r. Soc. Biol. 90, 1187; 1924.

herangetreten ist. Wieland[1] hebt aber hervor, dass der Nachweis der Apfelsäure bei dieser Reaktion nicht erbracht ist.

Wieland[1] hat der Desaminierung der Aminosäuren eine eingehende Untersuchung gewidmet: „Die zuerst von O. Neubauer[2] im Zellvorgang aufgeklärte Reaktion der Desaminierung der Aminosäuren, der Ersatz der NH_2-Gruppe durch OH, gekennzeichnet durch das Schema

$$R\cdot\underset{NH_2}{\underset{|}{CH}}\cdot COOH \rightarrow R\cdot\underset{NH}{\underset{\|}{C}}\cdot COOH \rightarrow R\cdot CO\cdot COOH \rightarrow R\cdot CHOH\cdot COOH$$

macht die direkte hydrolytische Ablösung der NH_2-Gruppe vom Kohlenstoff — es sei denn bei den Amiden oder allgemein bei dem Typ $-\underset{NH_2}{\underset{\cdot}{C}}=R-$ unwahrscheinlich. Die feste Haftung des basischen Stickstoffs am Kohlenstoff bildet vielmehr eine Grundregel der organischen Chemie."

Diesen letzteren Satz möchte der Verfasser auch den folgenden Betrachtungen voranstellen[3]. Nach eigenen Versuchen, welche parallel mit enzymatischen Untersuchungen ausgeführt wurden, kann behauptet werden, dass eine reine Hydrolyse des Glykokolls und Alanins durch verdünnte Säuren oder Basen als Katalysatoren nicht eintritt; auch kann Verfasser der Deutung, welche E. Baur[4] und sein Schüler K. Wunderly[5] ihren Versuchen geben, nicht beistimmen. Den Arbeiten von Neubauer, Knoop und Dakin zufolge beginnt der Angriff auf die Aminosäuren mit einer Dehydrierung, die unter Abspaltung zweier Wasserstoffatome entsprechend verläuft, wie bei primären und sekundären Alkoholen

$$-\underset{HNH}{\underset{|}{CH}}- \longrightarrow -\underset{NH}{\underset{\|}{C}}- \;;\quad -\underset{OH}{\underset{|}{CH}}- \longrightarrow -\underset{O}{\underset{\|}{C}}- \,.$$

„Hier und auch für die Aldehydgruppe ist die Möglichkeit der vitalen Dehydrierung experimentell festgelegt, indem z. B. die Essigsäuregärung auch unter Ausschluss von Sauerstoff zustande kommt, wenn man diesen normalen Wasserstoffacceptor durch Chinon oder Methylenblau ersetzt. Ebenso ist die sauerstofflose Dehydrierung der gesättigten Kohlenstoffkette im Übergang von Bernsteinsäure zu Fumarsäure einwandfrei erwiesen (Thunberg). . . Ob sich auch das dritte wichtige Grundsystem in der Zelle zum Abbau gelangender Stoffe, das der Aminosäuren, dieser Vorstellung einfügt, ist bisher experimentell nicht festgestellt."

[1] Wieland und Bergel, Lieb. Ann. 439, 196; 1924.

[2] O. Neubauer und Hans Fischer, H. 67, 230; 1910. — Neubauer und Fromherz, H. 70, 326; 1911.

[3] Siehe über die Stabilität der Aminosäuren gegen Säuren und Alkalien auch Abderhalden und E. Schwab, H. 136, 219; 1924, Nachtrag 137.

[4] E. Baur, Helv. Chim. Acta 5, 825: 1922.

[5] Wunderly, Zs physik. Chem. 112, 175; 1924.

Der wichtige experimentelle Beitrag zur Kenntnis der Desaminierung von Dakin und Dudley[1] besteht im Nachweis, dass Alanin unter NH_3-Abspaltung in Methylglyoxal übergeht:

$$\underset{\displaystyle NH_2}{CH_3\cdot \overset{}{CH}\cdot COOH} \longrightarrow CH_3\cdot \underset{\displaystyle \| \atop O}{C}\cdot CHO + NH_3$$

Für die enzymchemische Aufklärung der Desaminierung ist die Einsicht erforderlich, auf welchem Wege nicht-enzymatische Katalysatoren die Abspaltung von NH_3 aus den Aminosäuren bewirken. Durch Wieland und Bergel (l. c.) ist nachgewiesen worden, dass (bei Anwendung von Adsorptionskohle und Palladiumschwarz als Katalysator) aus verschiedenen Aminosäuren NH_3 und CO_2 in äquivalenten Mengen auftreten, daneben der um 1 C-Atom ärmere Aldehyd. Dementsprechend kann dieser Vorgang nach Wieland formuliert werden:

$$\underset{\displaystyle | \atop NH_2}{R\cdot CH}\cdot COOH \xrightarrow{1/2\,O_2} \underset{\displaystyle \| \atop O}{R\cdot CH} + CO_2 + NH_3\cdot$$

Auf die Frage ob und in welchem Grade die Warburgsche eisenhaltige Blutkohle tatsächlich ein Analogon zu den am Aminosäuren-Abbau beteiligten Enzymen darstellt[2] brauchen wir hier nicht einzugehen.

Unter den biochemisch in Betracht kommenden Reaktionen, welche zur Abspaltung des Ammoniaks aus Aminosäuren führen, kann schliesslich auch die Reaktion mit salpetriger Säure angeführt werden[3]:

$$H_2N\cdot CH_2\cdot COOH + NOOH \longrightarrow HO\cdot CH_2\cdot COOH + N_2 + H_2O\cdot$$

Die Reduktion der Nitrate zu Nitriten wird bekanntlich in vielen pflanzlichen und tierischen Geweben durch Reduktionsenzyme bewirkt. Es hängt von der Konzentration der beteiligten Stoffe und von der Acidität des Mediums ab, in welchem Grad sich diese Reaktion geltend machen kann.

Die Frage nach den bei der Desaminierung der Aminosäuren beteiligten Enzymen hat man oft versucht mit Hilfe von Dauerpräparaten, Autolysaten oder Organextrakten zu beantworten. Die zuverlässigen unter den Versuchen[4] haben jedenfalls gezeigt, dass ein die Aminosäuren desaminierendes Enzym aus keinem Material in Lösung gebracht werden kann.

---

[1] Dakin und Dudley, Jl Biol. Chem. 14, 555; 1913.

[2] Vgl. Warburg und Negelein, Biochem. Zs 113, 257; 1921.

[3] Und die gleichzeitige Bildung von OCH · COOH.

[4] Einige gegenteilige Angaben seien der Vollständigkeit wegen zitiert:

Material:	Substrat:	Autor und Schriftstelle:
Organbrei	Glykokoll, Leucin	Lang, Hofm. Beitr. 5, 321; 1904.
Placenta	Glykokoll	Savarè Hofm. Beitr. 9, 141; 1907.
Leber u. Darm	Glykokoll, Leucin	Bostock, Biochem. Jl 6, 48 u. 388; 1912.
Hefenemulsion		Effront, C. r. 146, 779 u. 151, 1007; 1910.

Über die Desaminierung von Aminosäuren durch Mikroorganismen verdankt man H. Pringsheim[1] eine eingehende Studie. Dieser Forscher zieht aus seinen Versuchen folgenden Schluss:

„Verschiedenen Pilzen wie der Hefe und Aspergillus niger kommt die Fähigkeit zu, aus stickstoffhaltigen Substanzen vor allem auch aus Aminosäuren, in denen die Aminogruppe festgebunden ist, Ammoniak abzuspalten. Diese Abspaltung ist enzymatischer Natur. Das desamidierende Enzym behält seine Wirksamkeit jedoch beim Behandeln der Pilze mit Aceton und Äther, d. h. bei der Darstellung der Acetondauerpräparate, nur in ganz geringem Masse bei. Auch Pilzpresssäfte haben keine Kraft mehr, um Aminosäuren zu desamidieren. Die weitere Umwandlung des desamidierten Restes in Alkohole durch Kohlensäureabspaltung wird bei der Hefe durch ein Enzym bewirkt, dessen Wirkung an die durch die Gegenwart von Zucker gebundene Entfaltung der Zuckervergärung gebunden ist und das seine Kraft durch die Abtötung mittels Acetons und Äthers verliert.

Besonders durch die klassische Untersuchung von Felix Ehrlich[2] über alkoholische Gärung der Aminosäuren ist das Ergebnis festgelegt, dass die dabei beteiligten Katalysatoren nicht von der Zelle abgetrennt werden können.

Bei einer tertiären α-Aminosäure ist der oxydative Abbau über die α-Ketosäure nicht möglich; nach K. Kurono[3] trat bei Gärversuchen mit d,l-Methyl-n-propyl-α-amino-Essigsäure eine optisch aktive Form dieser Säure auf und andererseits ein drehender Amylalkohol; dies macht es wahrscheinlich, dass die alkoholische Spaltung der tertiären Aminosäure über das Keton geht; ob dabei auch die Ketosäure durchlaufen wird, ist noch fraglich.

Zu entsprechenden Resultaten waren betr. tierischer Gewebe schon Abderhalden und Schittenhelm[4] gekommen und Levene[5] konstatierte das gleiche bezüglich der Leukocyten und der Nieren, Butkewitsch[6] bezüglich höherer Pflanzen.

Auf die bemerkenswerte Studie Fearons[7] über den Chemismus der Desaminierung der Aminosäuren kommen wir im III. Teil des Buches zurück.

Bei dieser Gelegenheit mag darauf hingewiesen werden, dass — vielleicht unter dem Eindruck E. Buchnerscher Arbeiten über Zymase — lange ein grosses Gewicht auf den Umstand gelegt wurde, ob eine katalysierte biochemische Reaktion von der Zelle abgetrennt werden kann oder nicht, und man findet besonders in der Literatur der neunziger Jahre und zu Anfang dieses Jahrhunderts Unterschiede zwischen Plasmareaktionen und enzymatischen Reaktionen betont, je nachdem es gelungen war oder nicht, die Katalyse von den frischen Zellen unabhängig zu machen. Gegenwärtig hat eine solche Unterscheidung wohl keine reelle Unterlage mehr. Zahlreiche Enzyme entstehen am Plasma und wir wissen, dass hinsichtlich ihrer Abtrennbarkeit und Löslichkeit grosse Unterschiede vorkommen.

---

[1] Pringsheim, Biochem. Zs 12, 15; 1918.
[2] F. Ehrlich, Biochem. Zs 2, 52; 1906. — 18, 391.
[3] K. Kurono, Biochem. Zs 134, 424; 1922.
[4] Abderhalden und Schittenhelm, H. 49, 26; 1906.
[5] Levene und G. M. Meyer, Jl Biol. Chem. 15, 475; 1913. — 16, 555; 1914.
[6] Butkewitsch, Biochem. Zs 16, 410; 1909.
[7] Fearon, Biochem. Jl 18, 576; 1924. — Siehe auch A. Hahn und Lintzel, Zs f. Biol. 79, 179; 1923.

Von hydrolytisch wirkenden Desamidasen der Aminosäuren kann also bis jetzt nur im hypothetischem Sinne gesprochen werden. Auch die Desaminierung der α-Aminosäuren durch niedere Pilze (vgl. z. B. Emmerling, Zbt. f. Bakt. 1903) ist eine oxydative, keine hydrolytische. Demgemäss werden wir auch keine synthetische enzymatische Wirkung im Sinne der Gleichung $NH_3 + HO \cdot CH_2 \cdot R \cdot COOH$ annehmen können.

Von grossem Interesse ist Knoops Hinweis auf die reversible Bildung von Aminosäuren aus α-Ketosäuren (Klin. Woch. 5; 1926).

Desaminierung des Tyrosins.

Einen besonderen Fall stellt die Desaminierung des Tyrosins insofern dar, als dieselbe in Gegenwart von Sauerstoff oder Oxydationsmitteln sehr leicht eintritt; man verdankt Chodat[1] und Bach[2] eingehende Untersuchungen über diese Reaktion[3]. Denselben zufolge wird Oxyphenylacetaldehyd gebildet, worauf dann die für die „Tyrosinase"-Wirkung charakteristischen roten und schwarzen Kondensationsprodukte und Melanine auftreten. Eine primäre hydrolytische Desaminierung des Tyrosins zu Oxyphenylmilchsäure ist zwar in einem Fall, und zwar mit Oidium lactis von Felix Ehrlich[4] gefunden worden, allgemein ist das primäre Eingreifen einer Desaminase am oxydativen Abbau des Tyrosins nicht erwiesen[5].

Auf die Tyrosinase und die Purin-Oxydasen kommen wir im letzten Abschnitt dieses Buches bei den „Oxydo-Reduktions-Enzymen" eingehender zurück[6].

[1] Chodat und Schweizer, Biochem. Zs 57, 430; 1913. — Arch. Sc. phys. et nat. 35; 140; 1913. Schweizer, Biochem. Zs 78, 37; 1916.

[2] Bach, Biochem. Zs 60, 226; 1914.

[3] Siehe hierzu auch M. E. Robinson und McCance, Biochem. Jl 19, 251; 1925. — Siehe auch Folpmers, Biochem. Zs 78, 180; 1916. — Haehn, Biochem. Zs 105, 169; 1920.

[4] F. Ehrlich und K. A. Jacobsen, Chem. Ber. 44, 888; 1911. — Siehe auch Y. Kotake, H. 143, 240; 1925.

[5] H. S. Raper und Wormall, Biochem. Jl 19, 84; 1925.

[6] Siehe hierzu M. Dixon und Thurlow, Biochem. Jl 18, 971; 1924.

16. Kapitel.

Di-Peptidasen.

Dieses Kapitel, das den enzymatischen Aufbau und Abbau der niederen Peptide (Di-Peptide) behandelt, bildet die Einleitung zur Beschreibung der eigentlichen Proteolyse, welche durch die Enzyme vom Typus des Pepsins, Trypsins und Papains bewirkt wird.

Die an Di-Peptiden geprüften Enzyme können und müssen in einem besonderen Kapitel behandelt werden; sie spalten zwar auch einen Teil des Substratgemisches, das als Pepton bezeichnet wird, aber nicht nur, dass die Hydrolyse der reinen Di-Peptide sich weitaus exakter und vollständiger behandeln lässt als diejenige der anderen Protein-Derivate und Protein-Abbauprodukte, sondern es scheint nach den Versuchen von Waldschmidt-Leitz der enzymatische Abbau der höher-molekularen Bestandteile des Peptons von demjenigen der niedrigen Peptide wesentlich verschieden zu sein.

Die Di- und Poly-Peptidasen bieten der Erforschung weit geringere Schwierigkeiten als die eigentlichen Proteasen, da die typischen Polypeptide ihrem chemischen Bau und ihrem Dispersitätsgrad nach bereits bekannt sind; der Chemismus der Spaltung tritt dadurch eindeutig hervor und ist quantitativen Messungen und Besprechungen zugänglich.

Trotzdem finden wir auch bezüglich der Peptidbildung und Peptidspaltung viele wesentliche Fragen noch unaufgeklärt, Fragen, deren Beantwortung für das Studium der ganzen Proteolyse und der Eiweisschemie überhaupt von grundlegender Bedeutung ist.

Bevor wir auf die Einzelheiten unseres Themas eingehen, müssen wir versuchen, eine natürliche Abgrenzung gegen die eigentlichen enzymatischen Proteolysen zu finden.

Was die Substrate betrifft, so können wir hier diejenigen Stoffe zusammenfassen, in welchen die Komponenten, die Aminosäuren, ausschliesslich durch die Carbamid-Bindung —CO·NH— in bekannter Weise verkettet sind. Wir behandeln also hier die ihrem Bau nach bekannten Polypeptide und ihre nächsten höheren Homologen, in denen wir eine analoge Verkettung der Aminosäuren mit grosser Wahrscheinlichkeit annehmen können.

Schwieriger ist es, eine Grenze hinsichtlich des Enzymmateriales zu ziehen, über welches ja bisher noch wenig Exaktes bekannt ist. Wir werden also in dieses Kapitel alle solchen natürlichen Säfte, Extrakte und Präparate einbeziehen, durch welche überhaupt die Bildung oder Spaltung

eines Repräsentanten der hier in Betracht kommenden Substratgruppe gelungen ist, unabhängig davon, welche Wirkungen das Enzymmaterial ausserdem an stickstoffhaltigen Stoffen ausübt.

In den Darstellungen des Enzymgebietes sind bisher aus leicht ersichtlichen Gründen die abbauenden Wirkungen, die Hydrolysen, zugrunde gelegt worden. In der Überzeugung, dass das eingehende Studium der enzymatischen Synthesen berufen ist, wesentlich zu der Entwicklung der Biochemie und der Physiologie beizutragen, will der Verfasser in diesem Werke versuchen, diejenigen Tatsachen hervorzuheben, welche über die Synthesen im Proteingebiet bekannt geworden sind. Von diesem Gesichtspunkt aus haben wir als Substrate in erster Linie die Aminosäuren zu betrachten.

A. Die am Aufbau der Proteine beteiligten Aminosäuren.

Alle als Eiweissbausteine bekannt gewordenen Aminosäuren enthalten die Aminogruppe in α-Stellung zum Carboxyl, was darauf hindeutet, dass ihre Bildung auf den gleichen Reaktionstypus zurückzuführen ist. In der Tat liegt es nahe, anzunehmen, dass die meisten von ihnen nach der Streckerschen Reaktion entstehen, also aus dem um 1 C-Atom ärmeren Aldehyd durch Anlagerung von NH_3 und HCN. Durch Verseifung des gebildeten Amino-Nitriles entsteht dann die entsprechende Aminosäure

$$R\cdot CH\begin{cases}NH_2\\ CN\end{cases} + 2\,H_2O \longrightarrow R\cdot CH\begin{cases}NH_2\\ COOH\end{cases} + NH_3.$$

Das Aminonitril enthält ein „asymmetrisches Kohlenstoffatom“ und wenn die Verseifung unter geeigneten Bedingungen durch eine optisch aktive Base bewirkt wird, so kann sie asymmetrisch geführt werden.

Abgesehen vom Glykokoll sind alle natürlichen α-Aminosäuren asymmetrisch gebaut und treten überwiegend oder ausschliesslich in einer rechts- oder linksdrehenden Form auf, welche sich genetisch mit der allgemeinen d- oder l-Reihe verknüpfen lässt (Karrer[1] und Mitarb.).

Hinsichtlich der Bezeichnung der sterischen Reihen schliessen wir uns im folgenden den Vorschlägen von Freudenberg bzw. Wohl und Freudenberg[2] an, welche sich auf die von E. Fischer geschaffenen Grundlagen stützen.

Soll ausgedrückt werden, dass eine Verbindung nach rechts oder links dreht, so wird vor ihren Namen das Zeichen (+) oder (—) gesetzt.

Diese Unterscheidung nach der beobachteten Drehung ist in vielen Fällen kennzeichnend, wie bei (+)-Glucose (Rechtsglucose) oder (+)-Weinsäure (Rechtsweinsäure) und vielfach die einzig mögliche. . . . In anderen Fällen aber ist diese Benennung nicht eindeutig oder

[1] Karrer und Mitarb, Helv. 6, 411 u. 957; 1923. — 8, 360; 1925.

[2] A. Wohl und K. Freudenberg, Chem. Ber. 56, 309; 1923.

wenig bezeichnend, so bei der Äpfelsäure, wo die Drehung mit der Änderung der Konzentration ihr Zeichen wechselt, oder bei der Glycerinsäure, wo ein Zeichenwechsel beim Übergang von der Säure zu ihren Salzen eintritt. . . . Im Gebiet der Zuckerarten und Oxysäuren ist für die eindeutige Unterscheidung der Antipoden die genetische Beziehung zu den beiden Formen des Glycerinaldehyds zweckmässig, als den gemeinsamen Ausgangspunkten eines hier eindeutig durchführbaren stereochemischen Systems.

Wird in Übereinstimmung mit der ursprünglich von E. Fischer bei den Zuckern getroffenen Wahl dem rechtsdrehenden (+)-Glycerinaldehyd die Formel I oder, wagerecht geschrieben, II und die Bezeichnung d-Glycerinaldehyd zuerteilt, so ist damit festgelegt, dass bei der üblichen Schreibweise mit der Carbonylgruppe oben bzw. rechts durch den Buchstaben d die Lage der Hydroxylgruppe rechts bzw. unten bezeichnet wird.

$$\text{I.}\quad \begin{array}{c} \mathrm{CHO} \\ \mathrm{H\cdot \dot{\underset{\cdot}{C}}\cdot OH} \\ \mathrm{CH_2\cdot OH} \end{array} \qquad\qquad \text{II.}\quad \begin{array}{c} \mathrm{H} \\ \mathrm{(HO)CH_2 - \dot{\underset{\cdot}{C}} - CHO} \\ \mathrm{OH} \end{array}$$

Dann ergibt sich aus experimentellen Feststellungen, dass die (—)-Glycerinsäure die Formel III hat, also d-Glycerinsäure ist und die (+)-Äpfelsäure (IV) d-Äpfelsäure usf. Alle Verbindungen mit einem asymmetrischen C-Atom, die sich genetisch vom d-Glycerinaldehyd ableiten lassen, in denen also am α-C-Atom (OH) rechts bzw. unten steht, gehören der d-Reihe an.

$$\text{III.}\quad \begin{array}{c} \mathrm{H} \\ \mathrm{(HO)CH_2 - \dot{\underset{\cdot}{C}} - COOH} \\ \mathrm{OH} \end{array} \qquad\qquad \text{IV.}\quad \begin{array}{c} \mathrm{H} \\ \mathrm{HOOC - CH_2 - \dot{\underset{\cdot}{C}} - COOH} \\ \mathrm{OH} \end{array}$$

Sollen die Aminosäuren zum Aufbau von höheren Eiweiss-Spaltprodukten verwendet werden, so müssen zunächst die in der Natur vorkommenden optisch aktiven Formen dargestellt werden. Eine sehr brauchbare von E. Fischer ausgearbeitete Spaltungsmethode beruht auf der Darstellung der Benzoylverbindungen, welche als starke Säuren mit optisch aktiven Basen die beiden isomeren Salze bilden, welche durch Kristallisation getrennt werden können. Auf diese Weise hat Fischer die Spaltungen zahlreicher Aminosäuren durchgeführt[1]. Formylverbindungen[2] haben den Vorteil, dass die Acylgruppe sich leicht wieder entfernen lässt.

Eine sehr brauchbare Methode von O. Warburg beruht auf der asymmetrischen enzymatischen Hydrolyse der Ester der Aminosäuren durch Lipasen[3] des Pankreassaftes.

Weitere Methoden zur Spaltung racemischer Verbindungen hat H. Scheibler in Houbens bekannten „Methoden der organischen Chemie" zusammengestellt (2. Aufl. 1922).

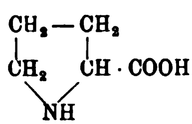
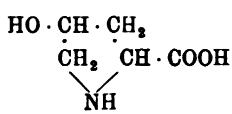
In der folgenden Tabelle sind diejenigen Aminosäuren, welche als Spaltprodukte der Proteine erkannt sind, aufgeführt.

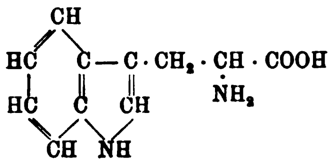
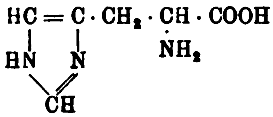
---

[1] E. Fischer, Chem. Ber. 32—34; 1899—1901.

[2] E. Fischer und O. Warburg, Chem. Ber. 38, 3997; 1905.

[3] O. Warburg, Chem. Ber. 38, 187; 1905. — Bezüglich Anwendungen siehe z. B. Abderhalden, Sickel und H. Ueda, H. 131, 277; 1923. — Fermentf. 7, 91; 1923.

Name der α-Verbindung	Formel	$[\alpha]_D^{20}$ in wässer. Lös.	Literatur über Drehung, Vorkommen, Darstellung
Glykokoll	$H_2N \cdot CH_2 \cdot COOH$		In Proteinen: Osborne und Mitarbeiter, Jl Biol. Chem. 3; Am. Jl Physiol. 17–20. — Abderhalden und Mitarbeiter, H. 45 bis 48.
d-Alanin	$CH_3 \cdot CH \cdot COOH$ NH_2	+ 2,7°	E. F., Ber. 32 (Darst.) und 40 (Drehung).
d-α-Aminobuttersäure	$CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH \cdot COOH$ NH_2	+ 8,0°	E. F. und Mouneyrat, Ber. 33.
d-Amino-isovaleriansäure (d-Valin) .	$CH_3 \cdot CH \cdot CH \cdot COOH$ $CH_3\ NH_2$		E. F., H. 33, 151. — Slimmer, Ber. 35. — Schulze, H. 17, 193. — Levene, H. 35.
l-Leucin	$CH_3 \cdot CH \cdot CH_2 \cdot CH \cdot COOH$ $CH_3\ \ NH_2$	— 10,4°	Ehrlich und Wendel, Biochem. Zs 8. — Zugehörigkeit zur l-Reihe: Karrer, Jäggi, Takahashi, Helv. 8.
d-Isoleucin	$CH_3 \cdot CH \cdot CH \cdot COOH$ $C_2H_5\ NH_2$	+ 9,74°	Ehrlich, Ber. 37, 1809.
d-Norleucin	$CH_3 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH \cdot COOH$ NH_2	+ 6,53°	Heckel, Sameč, Monatshefte 28 u. 29; 1907/08.
l-Serin	$CH_2 \cdot CH \cdot COOH$ $OH\ \ NH_2$	— 6,88°	E. F., Ber. 40, 1501. — E. F. u. Leuchs, Ber. 35.
l-Cystin	$S \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ $S \cdot CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$		Neuberg, Ber. 35, 3161.
Cystein	$CH_2 \cdot CH \cdot COOH$ $SH\ \ NH_2$		Sekundäres Spaltprodukt.
l-Phenylalanin ...	$C_6H_5 \cdot CH_2 \cdot CH \cdot COOH$ NH_2	— 35,1°	Schulze, H. 9 und 12. — E. F., H. 33, 151 und 412.
l-Tyrosin	$C_6H_4 \cdot CH_2 \cdot CH \cdot COOH$ $OH\ \ \ NH_2$	— 12,56 (4% HCl)	
l-Prolin		— 77,40°	
l-Oxyprolin		— 76°	E. F., Ber. 35, 2660.

Name der α-Verbindung	Formel	$[\alpha]_D^{20}$ in wässer. Lös.	Literatur über Drehung, Vorkommen, Darstellung
l-Tryptophan . . .		— 33°	Hopkins und Cole, Jl of Physiol. 27. — Ellinger, Ber. 37—40.
l-Histidin		— 39,74°	Kossel, H. 22, 176. — Knoop und Windaus, Hofm. Beitr. 7—10.
d-Lysin	$CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH \cdot COOH$ NH_2 NH_2		Ellinger, Ber. 31 u. H. 29. — Kossel u. Mathews, H. 25.
d-Ornithin	$CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH \cdot COOH$ NH_2 NH_2		Jaffé, Ber. 10 und 11. Kein primäres Spaltprodukt der Proteine.
d-Arginin	$CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH_2 \cdot CH \cdot COOH$ NH NH_2 $C{=}NH$ NH_2	In saurer Lösung rechtsdrehend	Gulewitsch, H. 27. — Kossel, H. 22. — Schulze und Winterstein, H. 26.
l-Asparaginsäure .	$CH(NH_2) \cdot COOH$ $CH_2 \cdot COOH$	+ 25,7° (4 % HCl)	Kommt meist als Amid (Asparagin) vor, selten (Henze, Ber. 34) frei. In Proteinen siehe Abderhalden und Mitarbeiter, H. 44—62.
d-Glutaminsäure . .	$CH_2 \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ $CH_2 \cdot COOH$	+ 12,04°	Skraup und Türk. — Abderhalden und Sasaki, H. 51.
β-Oxy-Glutaminsäure	$CH(OH) \cdot CH(NH_2) \cdot COOH$ $CH_2 \cdot COOH$		Dakin, Biochem. Jl 12, 290; 1918.

Sofern die in obiger Tabelle verzeichneten Stoffe als Substrate der Eiweisssynthese betrachtet werden, wäre ihnen noch das Asparagin beizufügen, welches nach den Ergebnissen von N. N. Iwanoff, Prjanischnikow u. a. wesentlich zur Synthese der pflanzlichen Eiweissstoffe beiträgt.

Die meisten dieser Aminosäuren sind in den genuinen Eiweisskörpern vertreten. Einige Proteingruppen, wie die von Kossel studierten Protamine sind einfacher, und zwar überwiegend aus Diaminosäuren zusammengesetzt.

Über die relativen Mengen, in welchen die verschiedenen Aminosäuren in einige typische Proteine eingehen, sollen die folgenden Tabellen eine Vorstellung geben. Die in der Literatur mitgeteilten Zahlen sind auf

Tierische Eiweissstoffe.

α-Aminosäuren	Eier-Albumin	Serum-Albumin	Serum-Globulin	Casein	Fibrin	Vitellin
Glykokoll	0,0	0,0	3,5	0,0	3,0	1,0
Alanin	2,5	2,7	2,2	1,3	3,6	0,7
Leucin	10,7	20,0	18,7	9,35	15,0	11,0
Isoleucin	—	—	—	1,43	—	—
Valin	2,5	—	—	7,2	1,0	2,4
Serin	—	0,6	—	0,5	0,8	—
Cystin	0,3	4,2	2,25	1,5	1,2	—
Phenylalanin	5,2	3,1	3,8	3,2	2,5	2,8
Tyrosin	1,8	2,1	2,5	4,5	3,5	3,4
Prolin	3,6	1,0	2,8	6,7	3,6	4,2
Oxyprolin	—	—	—	0,2	—	—
Tryptophan[1]	—	—	—	1,5	—	—
Histidin	1,7	3,4	2,8	3,8	6,4	1,9
Arginin	4,9	4,9	3,95	4,5	7,4	7,5
Lysin	3,8	13,2	9,0	7,7	11,1	4,8
Asparaginsäure	2,2	3,1	2,5	1,4	2,0	2,1
Glutaminsäure	9,1	7,7	8 5	15,5	10,4	1,3

Pflanzliche Eiweissstoffe.

α-Aminosäuren	Edestin aus		Erbsen Legumin	Zein	Hordein	Gliadin	Hefen-zymo-casein[3]
	Hanfsamen[2]	Baumwollsamen					
Glykokoll	3,3	1,2	0,4	0	0,0	0,7	7,4
Alanin	3,6	4,5	2,1	9,8	0,4	2,0	1,7
Leucin	20,9	15,5	8,0	20,0	5,7	6.6	3,2
Valin	+	+	1,0	1,9	0,1	3,3	—
Serin	0,3	0,4	0,5	1,0	—	0,1	—
Cystin	0,2	—	—	—	1,2	1,2	0,7
Phenylalanin	2,4	3,9	3,7	6,6	5,0	2,8	0,9
Tyrosin	2,1	2,3	1,6	4—10	1,7	1,2	2,4
Prolin	1.7	2,3	3,2	9	13,7	13,2	4,2
Oxyprolin	2,0	—	—	—	—	—	
Tryptophan	+	+	—	—	—	1,0	1,5
Histidin	1,1; 2,2	—	2,4	0,8	2,3	2,2	3,5
Arginin	11,7; 14,2	—	11,0	1,5	2,8	3,0	8,4
Lysin	1,0; 1,6	—	4,5	0,0	0,9	1,2	11,5
Asparaginsäure	4,5	2,9	5,3	1,7	—	0,6	+
Glutaminsäure	6,3	17,2	17,0	26	43	44	20
Ammoniak			2,1				9,3
			63,1				77,1

[1] Casein enthält nach Hopkins und Cole 1,5 % Tryptophan, nach Holm und Greenbank (Jl Am. Chem. Soc. 45, 1788; 1923) 2.2 %.

[2] Die linksstehenden Werte sind von Abderhalden angegeben, die 2 rechtsstehenden für Histidin, Arginin und Lysin von Kossel und Patten.

[3] Lüers und Nowak, Biochem. Zs 154, 310; 1924.

eine Dezimalstelle abgerundert wiedergegeben; eine grössere Genauigkeit ist nämlich in der Regel nicht erreicht worden, im Gegenteil ist vielfach mit sehr grossen Versuchsfehlern zu rechnen; auch ist die Konstanz des Materials kaum sichergestellt.

Histone und Protamine weichen in ihrer Zusammensetzung stark von den eigentlichen Eiweissstoffen ab.

Die Histone, welche wohl als Zwischenglieder zwischen eigentlichen Eiweissstoffen und Protaminen aufzufassen sind, enthalten neben reichlichen Mengen Arginin[1] noch die meisten Monoaminosäuren. So fanden Abderhalden und Rona im Thymushiston folgende prozentische Mengen:

Glycin	0,5	Prolin	1,5
Alanin	3,5	Phenylalanin	2,2
Leucin	11,8	Tyrosin	5,2

Glutaminsäure 0,5.

Die Protamine entstehen nach Kossel und Weiss[2] aus abgebautem Muskeleiweiss. Die Protamine finden sich nach den Studien von Miescher und besonders von Kossel im Sperma vieler Fische, und aus ihnen wurden die verschiedenen Stoffe wie Salmin, Clupein, Sturin usw. isoliert.

In den echten Protaminen beträgt der Basen-Stickstoff rund 90% des Gesamtstickstoffes. Es enthalten:

Salmin[3] (aus Rheinlachs)	Sturin[4]
87% Arginin	58,7% Arginin
	12,9% Histidin
	12,0% Lysin
	ausserdem Alanin und Leucin.

B. Die Polypeptide.

Die Polypeptide sind gekennzeichnet durch die zwischen je zwei Aminosäureresten bestehende Bindung $\cdot CO \cdot HN$. Fischer[5] hat auf die 4 Strukturisomerien hingewiesen, welche bereits beim einfachsten Dipeptid, dem Glycylglycin möglich sind (l. c. S. 568):

$$NH_2 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOH \qquad NH_2 \cdot CH_2 \cdot C(OH) : N \cdot CH_2 COOH$$

$$\underbrace{NH_3 \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COO} \qquad \underbrace{NH_3 \cdot CH_2 \cdot C(OH) : N \cdot CH_2 \cdot COO}$$

Hierzu ist noch zu bemerken, dass Bjerrum[6] in neuerer Zeit wahrscheinlich gemacht hat dass bei den α-Aminosäuren die Zwitterionen in

[1] Kossel und Pringle, H. 49, 302; 1906. — Kossel, H. 22 u. 25; 1897/98.
[2] F. Weiss, H. 52, 108; 1907.
[3] Vgl. Kossel, H. 88, 163; 1913.
[4] Kossel und Dakin, H. 44, 342; 1905.
[5] Siehe E. Fischers zusammenfassenden Vortrag Chem. Ber. 39, 530; 1906.
[6] Bjerrum, Zs f. physik. Chem. 104, 147; 1923.

erheblichem Grad auftreten; das gleiche ist von den Polypeptiden zu vermuten, wobei der Abstand zwischen der freien Amino- und Hydroxylgruppe eine wesentliche Rolle spielt.

„Eine weitere Komplikation erfährt die Frage nach der Struktur der Polypeptide, wenn sie Aminodicarbonsäure oder Diaminosäure enthalten. So musste für das Asparagylmonoglycin die Wahl zwischen den beiden Formeln

$$\begin{array}{ll} CO\cdot NH\cdot CH_2\cdot COOH & COOH \\ \dot{C}H\cdot NH_2 & \dot{C}H\cdot NH_2 \\ \dot{C}H_2\cdot COOH & \dot{C}H_2\cdot CO\cdot NH\cdot CH_2\cdot COOH \end{array}$$

offen bleiben[1]. Ebenso wenig konnte für das Dipeptid der Diaminopropionsäure eine Entscheidung zwischen den Formeln

$$NH_2\cdot CH_2\cdot CH(NH_2)\cdot CO\cdot NH\cdot CH_2\cdot CH(NH_2)\cdot COOH$$

oder $$\begin{array}{l} NH_2\cdot CH_2\cdot CH(NH_2)\cdot CO\cdot NH\cdot CH\cdot COOH \\ \qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\qquad\quad \dot{C}H_2\cdot NH_2 \end{array}$$

getroffen werden[2]."

Eine ausserordentlich grosse Zahl von Isomeriefällen ergibt sich durch Konfigurationsunterschiede der α-Aminosäuren, welche — mit Ausnahme des Glykokolls — ein asymmetrisches C Atom enthalten.

„Bei den Polypeptiden berechnet sich die Zahl der selbständigen optischen Isomeren nach der bekannten van't Hoffschen Formel zu 2^n. Z. B. ein Dipeptid von der allgemeinen Formel

$$NH_2\cdot \overset{*}{C}HR\cdot CO\cdot NH\cdot \overset{*}{C}HR\cdot COOH$$

muss wegen der beiden durch Sternchen markierten, asymmetrischen Kohlenstoffatome in vier aktiven Formen existieren, von denen je zwei eine racemische Verbindung bilden können. Bei Benutzung von racemischem Rohmaterial ist also a priori die Bildung von zwei isomeren inaktiven Substanzen zu erwarten, und diese müssen schon auftreten bei den halogenhaltigen Zwischenprodukten

$$Br\cdot \overset{*}{C}HR\cdot CO\cdot NH\cdot \overset{*}{C}HR\cdot COOH.$$

Derselbe Schluss gilt natürlich auch für die Umwandlung eines Dipeptids in ein Tripeptid, mit anderen Worten, für die Ankuppelung jeder weiteren Aminosäure mit einem asymmetrischen Kohlenstoffatom. Diese Isomerie ist zuerst bei dem Leucylphenylalanin[3] beschrieben worden."

Hinsichtlich des Aufbaues der optisch aktiven Polypeptide sind zwei Fälle zu unterscheiden: „Sind beide Komponenten einheitlich aktive Stoffe, so kann nur ein einziges Produkt entstehen; z. B. muss das Alanylalanin

[1] E. Fischer, Chem. Ber. 37, 4594; 1904.
[2] E. Fischer, Chem. Ber. 38, 4173; 1905.
[3] Leuchs und Suzuki, Chem. Ber. 37, 3306; 1904.

aus d-Alanylchlorid und d-Alaninester ein einheitliches optisch aktives Dipeptid sein. Ist dagegen die eine der Komponenten aktiv und die andere racemisch, dann ist die Entstehung von zwei optisch aktiven Substanzen zu erwarten, die aber keine optischen Antipoden sind. Dahin gehören die zahlreichen Kombinationen des aktiven Tryosins, Asparagins und der Asparaginsäure mit Alanyl, Leucyl, Phenylglycyl. Da die Isomeren hier keine optischen Antipoden sind, so ist die Möglichkeit vorhanden, sie durch blosse Kristallisation zu trennen."

Was die allgemeinen Eigenschaften der Polypeptide betrifft, so muss hinsichtlich Löslichkeit, Drehung, Fällbarkeit usw. auf die von ihrem Entdecker gegebene Zusammenfassung verwiesen werden (l. c. S. 575).

Ihre elektrolytischen Dissoziationskonstanten spielen bei der im folgenden notwendigen Betrachtung des Aciditäts-Optimums der enzymatischen Spaltung eine Rolle und verdienen deshalb hier besondere Erwähnung.

Wie ihre Komponenten, sind die Polypeptide Ampholyte, und das Verhältnis ihrer sauren Dissoziationskonstanten K_a und ihrer basischen Dissoziationskonstanten K_b ist von dem entsprechenden Verhältnis bei den Aminosäuren, wie nachfolgende Beispiele zeigen, nicht sehr verschieden. (K_a, K_b ist für die untersuchten Dipeptide rund tausendmal grösser als für die entsprechenden Aminosäuren).

Die Zahlenwerte gelten für 25° [1].

Ampholyt	K_a (25°)	K_b (25°)	Autor	Schriftstelle
Glykokoll	$1{,}8 \cdot 10^{-10}$	$2{,}7 \cdot 10^{-12}$	Winkelblech	Zs physik. Chem. 36, 546; 1901.
Alanin	$1{,}9 \cdot 10^{-10}$	$5{,}1 \cdot 10^{-12}$		
Leucin	$1{,}8 \cdot 10^{-10}$	$2{,}3 \cdot 10^{-12}$		
Phenylalanin	$2{,}5 \cdot 10^{-9}$	$1{,}3 \cdot 10^{-12}$	Kanitz	Pflüg. Arch. 118, 589; 1907.
Tyrosin K_{a1}	$4 \cdot 10^{-9}$	$2{,}6 \cdot 10^{-12}$		
K_{a2}	$4 \cdot 10^{-10}$			
Tyrosin K_{a1}	$4 \cdot 10^{-10}$		Harris	Proc. R. Soc. B. 95, 440; 1923.
K_{a2}	$4 \cdot 10^{-11}$			
Valin	ca. $2 \cdot 10^{-10}$	$2.0 \cdot 10^{-12}$		
Glycylglycin	$1{,}8 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-11}$	Euler	H. 51, 219; 1907.
„	$0{,}5 \cdot 10^{-8}$		Harris	Proc. R. Soc. B. 95, 440; 1923.
Alanylglycin	$1{,}8 \cdot 10^{-8}$	$2 \cdot 10^{-11}$	Euler	H. 51, 219; 1907.
„	$0{,}66 \cdot 10^{-8}$		Harris	Proc. R. Soc. B. 95, 440; 1923.
Leucylglycin	$1{,}5 \cdot 10^{-8}$	$3 \cdot 10^{-11}$	Euler	H. 51, 219; 1907.

Hinsichtlich der chemischen Reaktionsfähigkeit der Aminosäuren sei nur folgendes hervorgehoben:

Wegen der grossen Festigkeit, mit welcher die Aminogruppe an das

[1] Für die Temperatur 18° liegen Messungen von Dernby vor. Biochem. Zs 81, 107; 1917.

Kohlenstoffatom gebunden ist, kommt bei den Polypeptiden ebensowenig wie bei den Aminosäuren (vgl. Kap. 15, S. 387) ein eigentlicher hydrolytischer Ersatz von NH_2 gegen OH in Betracht.

Die für unsere folgenden Betrachtungen wesentlichste Reaktion, $R \cdot COOH + H_2N \cdot R_1 \rightleftarrows R \cdot CO \cdot NH \cdot R_1 + H_2O$ lässt sich bekanntlich ohne enzymatischen Katalysator in der Richtung der Peptidbildung schwer durchführen. Bei dieser Reaktion ist nämlich nicht $R \cdot COO^-$ die reagierende Molekülart, sondern $R \cdot CO^+$. Lässt man das Radikal CO^+ hervortreten, etwa durch Verwendung des Esters $H_2N \cdot R \cdot CO \cdot OC_2H_5$ oder des Säurechlorides $H_2N \cdot R \cdot CO \cdot Cl$, so geht die Synthese nach Fischers Vorschrift leicht vonstatten. Andererseits reagiert nicht der Ammoniumrest $^+H_3N \cdot R$, sondern der Aminrest, so dass auch für die nicht-enzymatische Synthese das Aciditäts-Optimum in der Nähe des Neutralpunktes liegen dürfte.

Die enzymatische Polypeptidspaltung wurde seit Abderhaldens Versuchen im allgemeinen als stark spezifisch angesehen, insofern als die in der Natur vorkommenden Aminosäuren enzymatisch angegriffen werden, während optischen Antipoden unangegriffen bleiben. Ferner schien aber nach Fischer und Abderhalden[1] die enzymatische Spaltbarkeit auch der natürlich vorkommenden Peptide von der Art und Anzahl der einzelnen Aminosäurekomponenten und ihrer Struktur abzuhängen. Erst durch die neuesten Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz mit reiner Peptidase hat sich das Spezifitäts-Problem zu klären begonnen. Wir kommen hierauf im Abschnitt E dieses Kapitels zurück.

In diesem Kapitel kommen die einfachen Peptide (Dipeptide) als Substrate fast ausschliesslich in Betracht.

C. Vorkommen der Peptidasen.

Die ersten Kenntnisse über die Peptidasen erhielt man durch Cohnheims[2] Entdeckung der peptonspaltenden Wirkung der Darmschleimhaut. Cohnheim schrieb dieselbe einem Enzym zu, das er Erepsin nannte. Einem Vorschlag von Euler und Josephson entsprechend wäre der Name Erepsin für das natürliche Gemisch[3] der Carbamasen beizubehalten, welches aus der Darmmucosa usw. sezerniert wird, und sich auch in anderen Säften und Geweben findet.

Enzyme, die in ihrer Wirkung sehr ähnlich derjenigen des Darmerepsins sind, wurden später im Pankreassaft, im Speichel und in anderen Sekreten nachgewiesen. Auch in Geweben sind polypeptidspaltende Enzyme vorhanden

[1] Fischer und Abderhalden, H. 46, 52; 1905.
[2] Otto Cohnheim, H. 33, 451; 1901. — Ferner H. 35–51; 1901/06.
[3] Analog den Bezeichnungen Invertin und Emulsin für natürliche Enzymgemische.

und ebenso kennt man, besonders durch die Untersuchungen von Vines, „pflanzliches Erepsin“. Ganz besonderes Interesse verdient die peptidspaltende Komponente des Papains, welche durch Willstätter bekannt geworden ist.

Wie bereits Seite 391 erwähnt, müssen die an definierten Polypeptiden gewonnenen Ergebnisse in der Besprechung von denen gesondert werden, welche an Peptonen, ähnlichen Substratmischungen und an Proteinen gewonnen worden sind. Bei der älteren Versuchsmethodik mit Pepton blieb meist unbekannt, welche Bestandteile des Peptons der Spaltung unterliegen, und so sind die gemachten Beobachtungen nicht scharf genug definiert, um Regelmässigkeiten hervortreten zu lassen. Von entscheidender Bedeutung ist der Nachweis von Waldschmidt-Leitz (H. 147—151), dass Peptidase (Erepsin) und tryptisches Enzym scharf zu trennen sind.

1. Peptidasen in Tieren.

a) Körperflüssigkeiten und Sekrete von Vertebraten.

1. Normales Blut. Während das normale Blutserum frei von Peptidasen ist[1], wurde Spaltung von Peptiden sowohl in Erythrocyten als in Leukocyten von Rind, Pferd, Hammel, Hund und Kaninchen nachgewiesen[2,3], und zwar von

Glycyl-l-Tryosin	dl-Alanylglycylglycin
dl-Alanylglycin (z. T.)	Glycyl-dl-Leucin.

Mit Blutplättchen des Rinderblutes erhielten Abderhalden und Manwaring[3] in manchen Fällen ebenfalls Spaltung, allerdings unregelmässig; Aktivierung durch Serum und Plasma (?).

J. W. Hall und G. S. Williamson[4] beobachteten Spaltung von Glycyltryptophan durch Schafsblut.

Unter anormalen Verhältnissen (Verbrühung und photodynamische Schädigung) hat H. Pfeiffer[5] Glycyltryptophanspaltung im Kaninchenserum und -Harn gefunden. Ferner im Menschen- und Meerschweinchen-Serum.

In diesem Zusammenhang muss schon hier auf die viel besprochenen Beobachtungen von Abderhalden[6] hingewiesen werden, dass in Serum, in welches blutfremde Peptone eingetreten sind, Enzyme ganz neu oder stark vermehrt auftreten, welche gewisse Peptide spalten.

[1] Siehe hierzu Abderhalden und Oppler, H. 53, 294; 1907. — Abderhalden und McLester, H., 55, 371; 1908.

[2] Abderhalden und Deetjen, H. 51, 334; 1907 u. 53, 280; 1907.

[3] Abderhalden und Manwaring, H. 55, 377; 1908.

[4] J. W. Hall und G. S. Williamson, Jl of Path. Bact. 15, 351; 1911.

[5] H. Pfeiffer, Zs Immun. 23, 473. — Fermentf. 8, 327; 1925.

[6] Abderhalden und Mitarbeiter, H. 61, 200. — 62, 120 u. 233; 1909. — 64—71. 1909/11. — Abderhalden, Die Abderhaldensche Reaktion, 5. Aufl. Berlin, 1922.

Es hat sich zunächst um eventuelle Spezifität gegen organfremdes Eiweiss gehandelt. Dann bestand längere Zeit die Möglichkeit[1], auf die Spaltung gewisser Peptide eine Enzymdiagnostik gründen zu können; diese Hoffnung hat sich bisher noch nicht erfüllt. Immerhin sind aus der Diskussion um die Abderhaldenschen „Abwehrfermente" bzw. um die „Abderhaldensche Reaktion" zahlreiche Tatsachen hervorgegangen, welche auch vom rein enzymchemischen Gesichtspunkt aus eine eingehende Darstellung rechtfertigen; eine solche wird im III. Teil dieses Werkes gegeben werden.

2. Milch. Frauenmilch spaltet Glycyltryptophan[2] (Warfield, Jl Med. Res. 25, 235; 1911. — Wohlgemuth und Strich, Preuss. Akad. 1910, 520. — H. Koch, Zs f. Kinderh. 10, 1; 1914).

3. Speichel. Glycyltryptophan wird gespalten (Warfield, Bull. J. Hopkins Hosp. 22, 150; 1911). — Koelker fand ausserdem, dass zahlreiche Dipeptide und das untersuchte Tripeptid l-Leucylglycyl-d-alanin angegriffen werden (H. 76, 27; 1911).

4. Magensaft. Im Magensaft findet sich normal keine Peptidase, sondern nur bei Rücktritt des Darminhaltes (Abderhalden und Schittenhelm, H. 59, 230; 1909).

Im carcinomatösen Mageninhalt fanden Neubauer und Hans Fischer ein peptidspaltendes Enzym; Nachweis mit Glycyltryptophan (Deutsch. Arch. f. k. Klin. Med. 97, 499; 1909).

Der Umstand, dass ein solches Enzym auch aus dem Darm oder Speichel in den Mageninhalt gekommen sein kann, hat Bedenken gegen die klinische Verwendbarkeit dieses Enzymnachweises hervorgerufen. Lit.: J. W. Weinstein, Jl Amer. Med. Ass. 57, 1420; 1911. — J. W. Hall und G. S. Williamson, Jl of. Path. Bact. 15; 1911. — J. C. Friedman und W. W. Hamburger, Arch. of Int. Med. 12, 346; 1913.

5. Pankreassaft. Gegen die meisten Dipeptide unwirksam.

6. Darm. Besonders hervorzuheben ist der wichtige Befund von Waldschmidt-Leitz, dass Peptidase des Pankreas und Darms identisch sind.

7. Harn. Einige Versuche von Abderhalden und Rona[1] an Glycyl-l-tyrosin ergaben keine Spaltung. Vielleicht nach Verfütterung von Pankreatin. — Eine Angabe von Sagel (Münch. med. Wochenschr. 1914) über organspezifische Peptidasen im Harn bei Paralyse bedarf einer Nachprüfung. — Umfassende Versuche an Glycyl-Tryptophan teilen H. Pfeiffer und Standenaht[3] mit.

---

[1] Siehe z. B. Abderhalden und Rona, H. 53, 308; 1907.

[2] Auch Brustdrüse der Frau (Tateyama, Biochem. Zs 163, 297; 1925).

[3] H. Pfeiffer und Standenaht, Fermentf. 8, 327; 1925.

b) Normale Organbreie und Organpresssäfte von Vertebraten.

Tier	Organ	Untersuchtes Peptid	Bemerkungen	Literatur
Rind	Muskelpresssaft	Glycylglycin, d,l-Leucylglycin, Glycyl-l-alanin u. a.	Spaltung	Abderhalden u. Teruuchi, H. 47, 466; 1906. — H. 49, 1; 1906.
Hund	Muskelpresssaft	Glycylglycin, Glycyl-l-tyrosin	erhebliche Spaltung	
Rind	Kolierter Leberbrei	d,l-Leucylleucin, dl-Leucylglycin, Glycyl d,l-alanin	asymm. Spaltung	
Rind	Lebergewebe	l-Leucyl-l-tryptophan	—	
Hund	Nierenpresssaft	Glycylglycin	Spaltung	
Kaninchen	Muskel, Leber, Niere	d,l-Leucylglycin, Glycyl-d,l-alanin, Glycylglycin	Spaltprodukte: l Leucin, Glycin. akt. Leucylglycinanhydrid	Abderhalden u. Hunter, H. 48, 517; 1906.
Kalb	Augen-Linse, Presssaft	d,l-Alanin, Glycyltyrosin, Diglycylglycin	gespalten	Abderhalden u. Lussana, H. 55, 390; 1908.
Kalb	Gehirnsubstanz	d,l-Alanylglycin, Diglycylglycin	Spaltung	
Embryonen von Huhn, Schwein u. a. in verschiedenen Entwicklungsstadien	—	Glycyl-l-tyrosin	nicht gespalten	Abderhalden u. Steinbeck, H. 68, 312; 1910.
Reptilien, Amphibien, Fische	Leber	d,l-Leucylglycin	—	Clementi, Atti Lincei 25 (1916).

c) Pathologische Organe und Gewebe.

Hier beanspruchen die Beobachtungen an Tumoren das grösste Interesse.

Neuberg[1] hat schon 1905 darauf aufmerksam gemacht, dass hinsichtlich der Peptonspaltung eine Organspezifität der Tumorenenzyme nicht statthat. Nachdem Leo Hess und P. Saxl zum Schluss gekommen waren, dass die Carcinomzelle in ihren proteolytischen Eigenschaften vollkommen den Zellen der normalen Gewebe gleicht, nahm besonders Abderhalden die Frage unter Verwendung reiner Polypeptide auf.

Am Glycyl-l-Tyrosin zeigten zunächst Abderhalden und Rona[2], dass diejenigen Carcinome, welche zu der Gruppe der Adenocarcinome gehören, das genannte Dipeptid genau ebenso spalten wie normale Gewebszellen.

[1] Neuberg, Berl. klin. Woch. 1905.

[2] Abderhalden und Rona, H. 60, 415; 1909.

Abderhalden, Koelker und Medigreceanu[1] fanden auch mit Presssaft von Tumorzellen asymmetrische Spaltung von dl-Leucylglycin; nur das natürlich vorkommende l-Leucylglycin wurde gespalten, nicht die d-Form. Abderhalden und Pincussohn[2] kamen immerhin zum Schluss, dass der Abbau von Polypeptiden durch Carcinomzellen anders verläuft als der durch normale Zellen; Regelmässigkeiten konnten nicht gefunden werden.

W. W. Hamburger[3] konnte in Krebsgeweben keine wesentliche Abweichung von der Peptidspaltung normaler Gewebe nachweisen.

K. Wiener[4] fand in einem carcinomatösen Exsudat Spaltung von Glycylglycin und Leucylglycin, aber keine Protease.

Nach Phosphorvergiftung fanden Abderhalden und Schittenhelm[5] den Presssaft einer Hundeleber gegen Glycylglycin und dl-Leucylglycin mindestens ebenso wirksam, eher wirksamer, als den eines normalen Tieres.

Über eine entsprechend gesteigerte Peptonspaltung durch Erepsin bei Phosphorvergiftung siehe Kobzarenko (Biochem. Zs 66), 17. Kap.

Über das Vorkommen von Peptidasen in Erythrocyten vgl. S. 401.

d) Avertebraten.

Jecur spaltet nach Clementi[6] Leucylglycin.

2. Peptidasen in höheren Pflanzen.

Die enzymatische Polypeptidspaltung haben Abderhalden und der Verf. gleichzeitig und unabhängig voneinander 1906/07 nach zwei verschiedenen Methoden studiert.

Kräftige Glycylglycinspaltung wurde von Euler[7] mit Presssaft aus keimenden Lupinussamen und mit einem daraus hergestellten Trockenpräparat erzielt; nicht ganz so wirksam waren Präparate aus Raps- und Erbsensamen.

An Leucylglycin wurde von Abderhalden und Schittenhelm[8] Spaltung der natürlichen l-Form durch Presssaft aus Lupinensamen nachgewiesen. Etwa gleichzeitig wies Verf. nach, dass im racemischen Gemisch auch die d-Form durch das gleiche Enzymmaterial gespalten wird. Auch Dialanylcystin wird nach Abderhalden und Schittenhelm[9] gespalten.

Der Einfluss der Keimung stellt sich nach den Versuchen des Verf.[10] folgendermassen:

[1] Abderhalden, A. H. Koelker und Medigreceanu, H. 62, 145; 1909.
[2] Abderhalden und Pincussohn, H. 66, 277; 1910.
[3] W. W. Hamburger, Jl Am. Med. Ass. 59, 847; 1912.
[4] K. Wiener, Biochem. Zs 41, 149; 1912.
[5] Abderhalden und Schittenhelm, H. 49, 40; 1906.
[6] Clementi, Acad. dei Lincei (5) 24, 972 u. 25, 183; 1916.
[7] Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 2, 31; 1906.
[8] Abderhalden und Schittenhelm, H. 49, 26; 1906.
[9] Siehe auch Abderhalden und Dammhahn, H. 57, 332; 1908.
[10] Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 2, 39; 1907.

Ungekeimte (Lupinen-) Samen bzw. ihr Presssaft sind unwirksam. Am 2. Keimungstag (Zimmertemperatur) war schon das Maximum der Peptidasenwirkung gegen Glycylglycin erreicht, wie folgende kleine Tabelle zeigt:

Tage der Keimung . .	2	4	6	8	10
Reaktionskonstante $k \cdot 10^4$	44	39	42	37	35

In Papain, Enzympräparaten aus dem Milchsaft von Carica papaya, fanden Abderhalden und Teruuchi[1] Spaltung von Glycyltyrosin; diese Angabe bestätigt sich nach den Untersuchungen von E. M. Frankel und von Willstätter und Grassmann[2] nicht. Frankel konnte mit keinem der Dipeptide Glycylglycin, Alanylglycin, Glycylalanin, Alanylalanin und Glycyltyrosin eine Spaltung erzielen, und zwar auch nicht durch HCN-aktiviertes Papain. Willstätter und Grassmann prüften Glycylglycin und dl-Leucylglycin mit negativem Ergebnis; mit letzterem Substrat wurde die Untersuchung bei verschiedener Acidität vorgenommen.

Dagegen wird, wie letztere Forscher zeigten, Leucylglycylleucin durch Papain mit HCN angegriffen, und zwar war ein Drittel in Dipeptid und Aminosäure gespalten.

3. Peptidasen in Pilzen und Bakterien.

Man verdankt die ersten und eingehendsten Versuche mit definierten Substraten (Polypeptiden) Abderhalden und seinen Mitarbeitern. Abderhalden und Rilliet[3] fanden im Presssaft von Champignon (Psalliota campestris) Spaltung verschiedener Dipeptide. Abderhalden und Pringsheim[4] sprechen sich über ihre Ergebnisse folgendermassen aus (l. c. S. 254):

„Aus diesen Versuchen geht hervor, dass die verschiedenen Pilze verschiedenartige peptolytische Fermente enthalten. Die Presssäfte aus Allescheria Gayoni, Rhizopus tonkinensis und Aspergillus Wentii spalteten l-Leucyl d-Leucin, während Presssaft aus Mucor mucedo dieses Peptid nicht angriff. . . . Wir sehen bei diesen niederen Organismen zum Teil wenigstens Fermente auftreten, die Bindungen lösen, auf welche die entsprechenden Fermente der höheren Organismen keinen Einfluss haben."

Koelker[5] hat mit Autolysesaft der Hefe dl-Alanylglycin gespalten.

Die Spaltung des Glycylglycins durch Autolysesaft der Hefe hat Dernby[6] eingehend untersucht; auf die kinetischen Messungen der beiden Autoren kommen wir im folgenden zurück.

Bakterien. Sasaki wies Spaltung des Glycylglycins und Glycyl-l-tyrosins durch Bact. coli commune nach[7]. Die nicht verflüssigenden Bakterien (Typhus, Paratyphus A und B, Bac. dysenteric. Flexner, Microc. tetragenus)

---

[1] Abderhalden und Teruuchi, H. 49, 21; 1906.
[2] Willstätter und Grassmann, H. 138, 184; 1924.
[3] Abderhalden und Rilliet, H. 55, 395; 1908.
[4] Abderhalden und H. Pringsheim, H. 59, 249; 1909. — 65, 180; 1910.
[5] Koelker, H. 67, 297; 1910.
[6] Dernby, Biochem. Zs 81, 107; 1917. Diss. Stockholm; 1917.
[7] T. Sasaki, Biochem. Zs 41, 174; 1912. — 47, 462; 1912.

hydrolysieren Glycyl-l-tyrosin und Glycylglycin in guter Ausbeute. Nach T. Mito[1] verläuft die Spaltung von racemischem dl-Leucylglycin (Bildung von l-Leucin) und von racemischem Glycyltyrosin durch Bact. coli und Staphylococcus albus asymmetrisch.

D. Darstellung und Reinigung.

In den meisten Untersuchungen sind Presssäfte direkt verwendet worden. Aus denselben lassen sich durch Fällen mit Alkohol oder Aceton mehr oder weniger wirksame Trockenpräparate in Pulverform herstellen, welche allerdings sehr grosse Mengen von Verunreinigungen enthalten; ihr Anteil wird verringert, wenn man den Presssaft vor der Alkoholfällung dialysiert.

Ob demgegenüber das Eindunsten des dialysierten Saftes im Vakuum nach Koelker[2] einen Vorteil bietet, erscheint zweifelhaft.

Die Peptidasen der Hefen lassen sich aus dem Autolysesaft gewinnen, die Dialyse unter vermindertem Druck nach Sörensen hat sich dabei als sehr geeignet erwiesen[3]. Koelker (H. 67) autolysiert 3—4 Tage bei Zimmertemperatur mit Zusatz von Chloroform und Calciumcarbonat (30 g Carbonat auf 500 g Bäckerhefe) und filtriert. Die Angabe von Dernby, dass eine Fortsetzung der Autolyse bei 38° nicht vorteilhaft ist, kann Verf. bestätigen. Durch wiederholte Filtration erhält man einen hellgelben klaren, aber sehr eiweissreichen Saft, den man zunächst durch Dialyse reinigt; dabei kann man die Dialyse unter vermindertem Druck nach Sörensen verwenden.

Handelt es sich um die Darstellung eines Peptidasenpräparates aus tierischem Material, so wird man die Schleimhäute, welche das Enzym sezernieren, waschen, dann von der Unterlage mechanisch ablösen, zerkleinern und extrahieren.

Die Extraktion kann durch Wasser bzw. Salzlösungen, z. B. physiologische Kochsalzlösung geschehen oder, da wässrige Erepsinlösungen wenig haltbar sind, durch Glycerin[4].

Bei den Versuchen von Josephson wurde abgeschabte Mucosa vom Dünndarm des Schweines 2 Tage mit Glycerin geschüttelt. Filtration durch Faltenfilter liefert einen klaren hellgelben Saft, von welchem 1 ccm zu 25 ccm 0,1 norm. Glycylglycinlösung zugesetzt in 90 Minuten eine Spaltung von 21% bewirkt.

Für die Behandlung der wässerigen Lösung hat Rice[5] ein Verfahren beschrieben: Der Brei der Dünndarmschleimhaut wird mit 0,1%iger Sodalösung 10 Tage bei 38° unter Toluolzusatz stehen gelassen. Man filtriert dann durch ein Tuch und säuert mit Essigsäure schwach an. Der sich langsam

[1] Mito, Acta scholae Med. Univ. Kyoto 5; 1921. — Ber. ges. Phys. 16, 17; 1923.
[2] A. H. Koelker, Jl Biol. Chem. 8, 145; 1910.
[3] Dernby, Biochem. Zs 81, 107; 1917.
[4] Euler, H. 51, 213; 1907.
[5] Fr. E. Rice, Jl Am. Chem. Soc. 37, 1319; 1915.

abscheidende flockige Niederschlag wird abfiltriert und das Filtrat wird dialysiert. Die Dialyse darf nicht zu lange ausgedehnt werden, sonst wird das Enzym geschwächt.

Untersuchungen von Fodor (Koll. Zs) siehe im 17. Kapitel.

Adsorptionsversuche.

Rice hat auch das Adsorptionsverhalten des Darmerepsins untersucht, aber, wie Waldschmidt-Leitz schreibt, „ohne sichere quantitative Bestimmungen".

Durch Kaolin wird Erepsin in saurer Lösung gut adsorbiert; Elution in alkalischer Phosphatlösung. Wesentliche Reinigungserfolge sind aber bis jetzt nicht erzielt worden.

Waldschmidt-Leitz hat die Tonerdeadsorption mit A. Harteneck an Pankreaserepsin und mit A. Schäffner an Darmerepsin studiert. Er fand im Gegensatz zu Rice die Tonerdeadsorption des Darmerepsins (wie auch des Pankreaserepsins) stark von h abhängig, und zwar in saurer Reaktion am höchsten, im alkalischen Gebiet sehr gering.

Durch Zusatz von Alkohol wurde die Adsorption bei pH 4,7 deutlich verstärkt, „allein die Empfindlichkeit des Enzyms auch gegen geringere Alkoholkonzentrationen lässt für eine präparative Anwendung dieses Mittels keine Vorteile erwarten".

Die Elution des Erepsins aus den Tonerdeadsorbaten gelingt in guter Ausbeute durch schwach alkalische Phosphatlösungen.

Waldschmidt-Leitz und Schäffner gelangten durch Tonerdeadsorption zu keiner merklichen Konzentrationssteigerung des Enzyms. „Zwar gelingt es dabei, die tryptische Verunreinigung der Enzymlösungen vollständig abzutrennen, den Erepsinwert der Elutionen findet man indessen, wohl infolge der unvermeidlichen Verluste, die insbesondere die Ausfällung der Phosphorsäure begleiten, nicht höher als vor der Adsorptionsvornahme."

Adsorptionstrennung der Peptidasen vom Trypsin durch Tonerde.

Sowohl Pankreaspeptidasen wie auch Darmpeptidasen lassen sich von dem sie begleitenden tryptischen Enzym durch Tonerdeadsorption befreien, und zwar auf Grund des Umstandes, dass das tryptische Enzym bei saurer Reaktion von der Tonerde nicht oder nur wenig aufgenommen wird (Waldschmidt-Leitz u. Mitarb.). „Es ist sehr bemerkenswert, dass das verschiedene Adsorptionsverhalten von Pankreaserepsin und Darmerepsin einerseits und von Pankreastrypsin andererseits unabhängig von der Natur der begleitenden Stoffe, in den rohen Auszügen der Pankreasdrüsen wie in denen der Darmschleimhaut, zur Geltung kommt." Wegen der Ausführung dieser Trennung sei auf die Originalarbeiten (H. 147, 286 u. zw. 304, sowie 151, 31 u. zw. 51) hingewiesen.

Über die Reinigung bzw. die Herstellung von Peptidasepräparaten von hohem Reinheits- und Wirksamkeitsgrad ist bis jetzt noch sehr wenig bekannt. Nach einer in diesem Laboratorium begonnenen Untersuchung ist die Schleimhaut des Schweinsdarms ein besonders günstiges Ausgangsmaterial.

Josephson[1]) trug von dem oben erwähnten Glycerin-Darmextrakt 85 ccm unter Kühlen und bei kräftigem Rühren in 250 ccm absol. Alkohol ein. Die Fällung wurde durch Zentrifugieren von der alkoholischen Flüssigkeit getrennt. Nach Waschen mit absol. Alkohol und Äther wurde das Präparat in einem Vakuum-Exsikkator von den letzten Ätherresten befreit. Ausbeute rund 1 g Trockenpräparat aus 100 ccm Darmextrakt.

Auch Waldschmidt-Leitz[2]) extrahiert die Darmschleimhaut mit (87%igem) Glycerin, von dem er die fünffache Menge verwendet.

Wirksamkeit und Reinheitsgrad.

Wir legen einstweilen die Spaltungsfähigkeit gegen Glycylglycin[3] den Wirksamkeitsangaben zugrunde und bezeichnen sie nach einem Vorschlag von Euler und Josephson[1] mit Gl f, das durch den Quotienten aus Reaktionskonstante und Trockensubstanzgehalt definiert sei, also durch die Gleichung

$$\text{Glycylglycin-Spaltungsfähigkeit Gl f} = \frac{k}{\text{g Trockensubstanz}}.$$

Wir führen die Aktivitätsbestimmung in folgender Weise aus: Zu der Versuchsmischung, enthaltend in 25 ccm Totalvolumen (nach Zugabe des Enzyms) 0,05 n. Glycylglycin + Natronlauge (pH = 7,9—8,0), wird nach dem Erwärmen der Lösung auf 37° (durch Einsenken in einen Thermostaten) die Enzymlösung zugegeben; die erste Probe (5 ccm) wird sofort der Lösung entnommen, in 5 ccm Formolmischung eingetragen und mit 0,2 n. Natronlauge titriert. Die nach verschiedenen Zeiten entnommenen späteren Proben werden dann in gleicher Weise behandelt und titriert. Die angewandte Reaktionsmischung reicht zu drei Bestimmungen (ausser der Nullprobe) des Reaktionskoeffizienten. Die übrigbleibenden 5 ccm sind zur Messung der Acidität bestimmt.

Bis auf weiteres führen wir die Aktivitätsbestimmungen ohne Puffer und ohne Zusatz von Aktivatoren ($Ca^{\cdot\cdot}$) aus, da der hemmende Einfluss des ersteren und die Aktivierungserscheinungen an der Darmpeptidase noch nicht genügend durchforscht sind[4].

Waldschmidt-Leitz schlägt vor, zur Aktivitätsbestimmung (ebenfalls auf Grund der Glycylglycinspaltung) als Erepsineinheit (Er.E.) das 1000fache derjenigen Enzymmenge anzugeben, für die sich unter festgestellten Bedingungen der Reaktionskoeffizient k = 0,001 ergibt; dann gibt dieser Reaktionskoeffizient die Anzahl von Enzymeinheiten in der untersuchten Probe an. Erepsinwert (Er.W.) ist nach Waldschmidt-Leitz die Anzahl von Enzymeinheiten in 1 g Präparat.

Über die entsprechende „Pankreaserepsineinheit" (P.Er.E.) siehe Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 147, 286 u. zw. 295; 1925.

---

[1] Euler und Josephson, Chem. Ber. 59, 226; 1926. — Siehe auch Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 9, Nr. 24; 1925.

[2] Waldschmidt-Leitz und Schäffner, H. 151, 31; 1926.

[3] Siehe Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 2, 31; 1906.

[4] Vgl. hierzu auch die Ergebnisse von Willstätter und Grassmann, H. 138, 184; 1924.

E. Wirkungsbedingungen.

1. Acidität.

An reinen Dipeptiden hat Verf.[1] 1906 den Versuch gemacht, die optimale Acidität der enzymatischen Spaltung zu bestimmen, und zwar mit der Methode der Leitfähigkeit, welche gestattete zu ermitteln, welcher Anteil der zugesetzten Natronlauge gebunden wird und wieviel freie Natronlauge (freie Hydroxylionen) sich bei der Reaktion in Lösung befinden. Die optimale Konzentration des freien Alkalis wurde damals zu 0,000010 n bzw. 0,000012 n angegeben, und zwar für die Glycylglycin-Spaltung durch Darmpeptidase bei 37°. Setzt man für diese Temperatur $K_w = 3{,}1 \cdot 10^{-14}$, so entspricht dies einer Acidität von pH = 8,5 bzw. 8,6. Spätere Versuche, die mit G. Hofrén-Lagerberg, unter Benutzung der einstweilen bekannt gewordenen natürlich viel genaueren und zweckmässigeren Methodik Sörensens ergaben 8,2—8,4, was unter Berücksichtigung der durch die ältere Methodik bedingten Fehler als eine gewisse Bestätigung der ersten Resultate angesehen wurde. An Pepton als Substrat fanden Rona und Arnheim[2] später als Optimum pH = 7,8 (vgl. 17. Kap.).

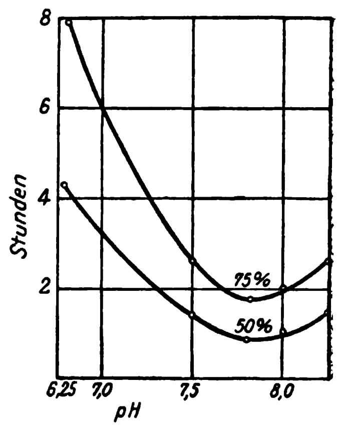


Fig. 47.

Dernby[3] gibt in seiner eingehenden Untersuchung an, dass das optimale pH bei Darmerepsin um einige Zehntel höher liegt als bei Hefenerepsin (siehe unten); Dernbys Befund würde also auf etwa 8,0 zu setzen sein. Dasselbe pH-Optimum fanden Euler und Josephson bei ihren neuen Versuchen[4]. Die Peptiden aus Pakreasextrakt[5] ergaben auf Glycylglycin als Optimum pH = 7,9, also nahe dieselben Werte wie beim Darmerepsin.

Auch Waldschmidt-Leitz[6] fand das Optimum des Pankreaserepsins, wie später das des Darmerepsins bei etwa pH = 7,8.

Zur Untersuchung des entsprechenden Punktes bei Hefenereptase hat Dernby (Biochem. Zs 81, S. 79) eine Versuchsflüssigkeit folgender Zusammensetzung verwendet:

10 ccm 0,4 n-Glycylglycin + 2 ccm 0,2 n Natronlauge + 5 ccm Enzymlös. + 20 ccm 0,2 mol. Phosphat + aqua ad 100 ccm.

---

[1] Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi, 2, Nr. 31; 1906 und Nr. 39; 1907.
[2] Rona und Arnheim, Biochem. Zs 57, 84; 1913,
[3] Dernby, Biochem, Zs 81, 107; 1917. Dissertation Stockh. 1917.
[4] Euler und Josephson, Chem. Ber. 59, 226; 1926. — Vgl. Waldschmidt-Leitz und Schäffner, H. 151, 31; 1926.
[5] Dernby, Jl Biol. Chem. 35, 179; 1918.
[6] Waldschmidt-Leitz und Anna Harteneck, H. 147, 286; 1925.

In der Figur 47 stellt Dernby die bei verschiedener Acidität zu einer Spaltung von 50 bzw. 75% erforderlichen Zeiten zusammen. Abderhalden und Fodor haben auf Grund ausgedehnter Untersuchungen hervorgehoben, dass die optimale Acidität der Polypeptidspaltung von der Natur des Substrates abhängt. Die genannten Forscher fanden folgende Aciditäts-Optima:

		pH des Optimums
In annähernd äquimolekularen Lösungen gespalten	Glycyl-l-leucin	8,41; 8,50
	l-Leucylglycin	7,50; (7,56)
	d-Alanylglycin	7,30; 8,13
	Glycyl-d-alanin	7,30—7,91
	d-Alanyl-l-leucin	6,76; 6,85
	l-Leucyl-d-alanin	6,80—7,89
l-Leucyl-l-asparaginsäure 2%ig		6,76
l-Leucyl-l-asparaginsäure 10%ig		6,80
In annähernd äquimolekularen Lösungen gespalten	l-Leucylglycin	7,56
	l-Leucylglucylglycin	7,26
	l-Leucyldiglycylglycin	7,29
	l-Leucyldiglycylglycin	7,28
	l-Leucylpentaglycylglycin	6,64

Abderhalden und Fodor[1] entnahmen ihren Messungen folgende Ergebnisse: „Polypeptide, die aus gleichen Bausteinen aufgebaut sind, zeigen in ihrem optimalen Verhalten in den meisten Fällen gewisse Übereinstimmungen, wenn auch diese Erscheinung nicht durchgehends gültig ist."

„Während Glycyl-l-leucin, l-Leucylglycin, ferner die Polypeptide l-Leucylglycin bis l-Leucyl-pentaglycylglycin sowie auch Leucyl-l-asparaginsäure ein sehr scharfes Optimum besitzen, ist es bei den Polypeptiden, die als Baustein Alanin enthalten (mit Ausnahme von d-Alanyl-l-Leucin) nicht der Fall."

„Zwei weitere Faktoren beeinflussen ferner des öfteren die Lage des Optimums: die Hefesaftkonzentration und das Alter des Saftes."

Zweifellos haben Abderhalden und Fodor vollkommen recht, wenn sie betonen, dass man bei denjenigen Enzymen, bei welchen nicht nur ein einziges Substrat in Betracht kommt (wie etwa bei der Saccharase der Rohrzucker, abgesehen von der Raffinose), sondern eine grössere Reihe von Substraten nicht von vornherein ein gemeinsames pH annehmen darf. Es ist ja überhaupt nicht das Enzym an sich, welches ein Aciditätsoptimum besitzt (die Acidität der maximalen Stabilität gehört nicht hierher), sondern die enzymatische Reaktion.

Im grossen ganzen kann gesagt werden, dass die Peptidasen der tierischen Organe nahe bei der natürlichen Acidität derselben ihre grösste Wirksamkeit entfalten, nach Myers und Clendon ist diese vielleicht etwas nach der sauren Seite verschoben.

[1] Abderhalden und Fodor, Fermentforschung 1, 533; 1916. — Siehe hierzu auch Fodor, Das Fermentproblem (1922) und: Die Grundlagen der Dispersoidchemie, Dresden 1925.

Für den Fall, dass die Polypeptide der enzymatischen Spaltung in Form ihrer Akalisalze (als Anionen) unterliegen, würde — unter sonst übereinstimmenden Umständen — die Acidität um so günstiger sein, je vollständiger die Salzbildung mit dem Peptid, je geringer also der Hydrolysegrad ist. Dementsprechend würden stärker saure Peptide eine geringere Alkalinität erfordern als schwächere Säuren, und man wird dann, wie Verf. getan hat, die Salzbildung des Substrates neben seiner isoelektrischen Form in Betracht ziehen.

Abderhalden und Fodor betrachten ihre Ergebnisse vom kolloidchemischen Standpunkt aus und betonen, dass „auch diese Fragen das Studium der Adsorptionsbedingungen der amphoteren Elektrolyte, vorzüglich der Aminosäuren und Polypeptide in Abhängigkeit von der Acidität dringend erfordern". — Über den Einfluss der Acidität auf die Kinetik der enzymatischen Peptidspaltung siehe S. 414—415.

Einfluss auf die nicht-enzymatische Hydrolyse: Levene und Mitarb.[1].

2. Neutralsalze.

Hier weichen wieder die Angaben über Hefen-Peptidasen und tierische Peptidasen voneinander ab.

Nach Untersuchungen von Koelker[2] an Hefen-Peptidase und Alanylglycin beschleunigt $CaCl_2$ in 0,1%iger Lösung die Hydrolyse, hemmt aber schon in 1%iger Lösung. Dagegen findet Abderhalden[3] auf dl-Leucylglycin und Glycyl-l-tyrosin durchweg „deutlich beschleunigenden Einfluss", wogegen er mit $MgSO_4$ und $MgCl_2$ nur eine schwache Verzögerung[3], mit ($SrCl_2$ gar keine Wirkung fand. Auch NaCl (physiologische Kochsalzlösung) beeinflusst nach Abderhalden und nach Koelker die Reaktionsgeschwindigkeit nicht. NaF soll nach Abderhalden[4] an dl-Leucylglycin hemmen, bei Glycyl-l-tyrosin in geringer Konzentration beschleunigen. Bei Abderhaldens Versuchen mit Cyankalium ist die Aciditätsveränderung nicht berücksichtigt; siehe hierzu Dernby, l. c. S. 199.

An Darm-Peptidase fand Dernby (l. c.) durch Na- und K-Salze in 0,4 normaler Konzentration ziemlich starke Hemmung, am meisten mit Nitraten, am wenigsten mit Fluoriden.

Waldschmidt-Leitz und Schäffner (H. 151) konnten dagegen nach Zusatz von Alkalisalzen einwertiger, anorganischer Anionen keine Hemmung beobachten.

Durch Phosphat-Puffermischung schon in 0,04 mol. Konz. wird Darmpeptidase (nicht aber Hefenpeptidase) wesentlich gehemmt (Dernby).

[1] Levene, Simms und Pfaltz, Jl Biol. Chem. 61, 445; 1924.

[2] Koelker, Jl Biol. Chem. 8, 145; 1910.

[3] Vermutlich tritt hier das bei alkalischer Reaktion gebildete $Mg(OH)_2$ mit dem Enzym zusammen und fällt teilweise aus.

[4] Abderhalden, Caemerer und Pincussohn, H. 59, 293; 1909.

a) 10 ccm 0,4 n-Glycylglycin + 4 ccm n/5·NaOH + 20 ccm Erepsin (d) + Wasser = 100 ccm.
b) Dasselbe + 18,2 ccm m/5 sek. + 1,8 ccm m/5 prim. Phosphat = 100 ccm. $t = 38^{0}$.

Verdauungs-zeit in Stunden	a		b		Verdauungs-zeit in Stunden	a		b	
	°/o N	pH·	°/o N	pH·		°/o N	pH·	°/o N	pH·
0	0	7,8	0	7,8	0	0	7,8	0	7,8
3	12	—	9	—	2	12	—	7	—
8	32	—	14	—	7	32	—	—	—
21	65	8,4	24	7,8	24	76	8,6	26	7,8

Waldschmidt-Leitz und Schäffner bestätigen diesen Befund und finden, dass durch ihre Phosphatpufferkonzentration (bei pH = 7,8) die Enzymwirkung auf etwa ein Drittel herabgesetzt wird (Bindung von Ca).

Bemerkenswert ist der Befund von Abderhalden und Fodor, dass sich das pH-Optimum der Peptidspaltung durch Neutralsalze um eine Einheit verschieben kann.

Abderhalden und Fodor[1] haben dann noch eingehende Versuche angestellt über den Einfluss von Kochsalzzusätzen in verschiedenen Zuständen des Saftes, die je nach dem Alter wechselten sowie über die Anionenwirkung auf Säfte, deren Zustand nahezu gleich war (l. c. S. 94 u. ff.). Verf. möchte um so weniger versäumen, auf diese Untersuchungen[2] ausdrücklich hinzuweisen, als dieselben von speziellen Gesichtspunkten aus angestellt und bearbeitet worden sind, von deren Fruchtbarkeit sich der Verf. selbst noch nicht hat überzeugen können. Abderhalden und Fodor heben zusammenfassend folgende Resultate hervor (S. 207):

1. „Wie das Optimum selbst, so wird auch der Einfluss von Neutralsalzen in erster Reihe vom kolloiden Zustand des Fermentes bedingt.

2. Der Endeffekt des Salzzusatzes ist von komplexer Natur und besitzt als Voraussetzung sowohl lyotrope als auch unmittelbar auf das Kolloid einwirkende Faktoren.

3. Bei den verwendeten Mischungen von Substrat + Regulatoren + Hefenauszug ergeben Zusätze von 0,66 äqu. Neutralsalz per Liter in den ersten Zeitintervallen in der Regel eine geringe Förderung, der jedoch alsbald eine Hemmung der Wirkung folgt. Jodkalium sowohl als auch Rhodankalium hemmen bereits in den erwähnten Konzentrationen sehr stark, während die Salze KCl, KBr, KNO_3 und K_2SO_4 erst bei höheren Konzentrationen von 0,66 äqu. L bedeutende Hemmungen aufweisen."

3. Aktivatoren und Hemmungsstoffe.

Über Aktivatoren der enzymatischen Dipeptidspaltung haben Abderhalden und Wertheimer[3] Mitteilungen gemacht, welche, falls sie an anderem Material und unabhängig von der Acidität wiedergefunden werden, von wesentlicher Bedeutung für die Kinetik der Peptidasen wären. Diese

[1] Abderhalden und Fodor, Fermentf. 4, 191; 1920.
[2] Siehe hierzu auch Fodor, Das Fermentproblem. Dresden und Leipzig, Steinkopff, 1922.
[3] Abderhalden und Wertheimer, Fermentf. 6, 1; 1922.

Aktivatoren wurden aus Hefeautolysat und aus alkoholischem Hefeauszug gewonnen.

„Sämtliche nach der Formoltitration und durch Beobachtung der Drehungsänderung ausgeführten Untersuchungen zeigten, dass sowohl Hefeautolysat als auch das alkoholische Extrakt aus Hefe den Abbau der untersuchten Dipeptide (besonders Leucylglycin) unter den gewählten Bedingungen beschleunigten." „Durch Kochen wird der Einfluss der die Hefestoffe enthaltenden Lösungen verringert. Wird das Kochen auf eine Stunde ausgedehnt, dann ist jeder günstige Einfluss vernichtet." „Besonders interessant ist die Beobachtung, dass Hefeextrakt, das der Dialyse unterworfen wird, unwirksam wird, und zwar war sowohl das Dialysat als der nicht dialysierte Teil ohne jeden Einfluss auf den Verlauf der Hydrolyse des Dipeptids dl-Leucylglycin. Wurden dagegen die beiden Lösungen, d. h. das Dialysat und der nicht dialysierte Teil wieder vereinigt, dann ergab sich eine deutliche Wirkung." „Es zeigte sich, dass Schilddrüsen- und Thymusopton die Spaltung (der Dipeptide) deutlich beschleunigen, während die aus Hypophyse, Hoden, Ovarien, Corpus luteum gewonnenen Optone ohne Einfluss sind." Ferner beschleunigen nach Abderhalden und Wertheimer Jodothyrin und Glycyl-3,5-l-dijodtyrosin sowie in geringem Grad Plazentaopton".

„Wurde das Opton aus Thymus und Schilddrüse 20 Minuten lang gekocht, dann wurde es unwirksam." „Auch hier zeigte es sich, dass das Dialysat und der nicht dialysierte Teil für sich angewandt, keine Wirkung mehr zeigten. Bei der Vereinigung beider Produkte trat wieder eine deutliche Wirkung hervor."

Einen kleinen Effekt im gleichen Sinne erhielt kürzlich Josephson bei der Wiederholung des obigen Versuchs mit Autolysesaft von Hefe (H. 161).

Verdünntes Phenol hat auf die Glycylglycinspaltung nach Dernby keinen Einfluss.

F. Kinetik.

Kinetische Untersuchungen der Peptidasen müssen nunmehr an niederen Polypeptiden und besonders an Dipeptiden vorgenommen werden. Ein grosser Vorteil besteht zunächst in der Durchsichtigkeit des chemischen Vorgangs und — was damit in Zusammenhang steht — in der Möglichkeit, den gefundenen Endpunkt mit dem theoretisch berechneten zu vergleichen. Ferner aber ist das Substrat durch seine Konzentration eindeutig definiert, Zustandsverschiedenheiten, die in unkontrollierbarer Weise mit dem Alter, überhaupt der Vorgeschichte zusammenhängen, treten bei den kristallisierbaren Peptiden nicht auf.

Bei meinen ersten kinetischen Messungen an Dipeptiden[1] wurden tierische Enzymlösungen angewandt, und zwar teils reiner Pankreassaft aus dem Laboratorium Pawlows, teils Glycerinextrakt aus Schweinsdarm, ferner bei einigen Versuchen Pankreatin (Rhenania).

Als Messmethode kam Bestimmung der Leitfähigkeit zur Anwendung. Versuchstemperatur war 37°. Ermittlung der optimalen Alkalinität s. S. 409.

1. Zeitlicher Verlauf.

Der zeitliche Verlauf der Glycylglycinspaltung sei durch einige Zahlenbeispiele erläutert:

[1] Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 2, 81; 1906.

0,10 n-Glycylglycin, 0,04 n-Alkali (entspricht etwa pH = 8).

5 g Erepsinpräp. in 100 ccm

Minuten	1000 (a—x)	k·10[4]
0	930	—
7	837	65,4
13	763	66,0
20	690	64,8
28	620	63,0
36	550	63,3

3 g Erepsinpräparat in 100 ccm

Minuten	1000 (a—x)	k·10[4]
0	980	—
10	915	29,8
20	861	28,1
32	809	26,0
41	760	27,0

Als Ergebnis dieser ersten Untersuchung wurde festgestellt, „dass die Spaltung des Glycylglycins eine Reaktion erster Ordnung ist, und dass die entsprechenden Geschwindigkeitskoeffizienten k unter günstigen Umständen bis zum Ablauf der halben Reaktion wirklich konstant bleiben“. Später trat eine Abnahme der k-Werte ein (beginnende Enzymzerstörung).

Dieses Ergebnis wird von Dernby sowohl mit Darmpeptidase als mit Hefenpeptidase bestätigt. Von seinen Tabellen seien die folgenden angeführt, die sich auf die Hefenpeptidase beziehen:

10 ccm 0,4 n-Glycylglycin + 4 ccm $^n/_5$-NaOH + 1 ccm Enzym (b) + 20 ccm Phosphat + Wasser = 100 ccm. $pH^\cdot = 7{,}8$. $t = 38^0$.

Verdauungszeit in Stunden	% Aminostickstoff x	k
0	0	—
1	13,8	0,157
2	25,9	0,150
3	36,2	0,150
4	44,9	0,150
5	55,2	0,157
8	69,0	0,145
10	75,9	0,143
12	82,8	0,147
24	96,6	(0,138)

10 ccm 0,4 n-Glycylglycin + 4 ccm $^n/_5$-NaOH + 10 ccm Enzym (a) + 20 ccm Phosphat + Wasser = 100 ccm. $pH^\cdot = 7{,}8$. $t = 38^0$.

Verdauungszeit in Stunden	% Aminostickstoff x	k
0	0	—
3	28,6	0,113
6	50,1	0,115
9	62,0	0,108
21	90,6	0,113
30	93,0	(0,090)

Rechnet man die Konstanten, wie üblich auf Minuten um, so erhält man $k \cdot 10^4 = 26$ bzw. 20.

Abderhalden und Fodor[1] kamen, im Gegensatz zum Verf. und zu Dernby, zum Ergebnis, dass der zeitliche Verlauf der Peptidspaltung durch Hefen-Peptidase von der Acidität stark abhängig sei. Da aber neuerdings die Versuche des Verfassers und diejenigen von Dernby durch die eingehende Untersuchung von Waldschmidt-Leitz durchaus bestätigt wurden, so mag

[1] Abderhalden und Fodor, Fermentforsch. 1, 533; 1916.

ein Hinweis auf die betreffenden Arbeiten von Abderhalden und Fodor genügen.

Von den Versuchen von Waldschmidt-Leitz und Schäffner sei beispielsweise der folgende angeführt (l. c. S. 41).

Reaktionsverlauf bei pH = 7,0.

0,660 g Glycyl-glycin, 15,0 ccm Glycerinauszug, im Gesamtvolumen von 50,0 ccm; pH eingestellt durch 25,0 ccm 0,2 mol.-Phosphatpuffer von pH = 7,8 + 4,5 ccm 0,2 n-NaOH; 30°; zur Analyse entnommen je 10,0 ccm.)

t Min.	Aciditätszunahme ccm 0,2 n-KOH	Spaltung %	$k = \frac{1}{t} \cdot \log_{10} \frac{a}{a-x}$
38	1,28	23	0,00309
60	1,84	36	0,00290
120	3,02	56	0,00296

Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck (H. 147, S. 294) fanden für Leucylglycin und Pankreas-Peptidase folgenden Reaktionsverlauf:

1,00 ccm Glycerinauszug aus roher Pankreasdrüse.

Min.	Aciditätszunahme ccm 0,2 n-KOH	$k \cdot 10^4$
15	0,18	9,8
30	0,37	9,7
60	0,72	9,7
120	1,28	9,2
180	1,85	9,5
240	2,29	9,3

Schliesslich sei auch ein Versuch von Willstätter und Grassmann[1] über Hefen-Peptidase hierhergesetzt, pH-Optimum 7,8.

Spaltung von Leucylglycin durch verschiedene Enzymmengen

(Enzym mit 1 ccm m/3-Primärphosphat-Ammoniakmischung von pH = 7,8; 0,225 (6/5 Millimol) Peptid; Enzym und Substrat mit NH_3 vorher auf pH = 7,8 eingestellt. Vol. 10 ccm. — 40°. — Spaltung in ccm n/5 KOH.)

Minuten	Enzymmenge (ccm Autolysat in 10 ccm der Mischung)									
	0,25		0,50		1,0		2,0		4,0	
	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.
15	—	0,04	—	0,08	0,23	0,17	0,40	0,33	0,49	0,63
30	—	0,08	0,16	0,17	0,43	0,33	0,63	0,63	0,99	1,12
60	0,17	0,17	0,32	0,33	0,63	0,63	1,09	1,12	1,67	1,83
120	0,28	0,33	—	—	—	—	—	—	—	—

[1] Willstätter und Grassmann, H. 153, 250; 1926.

Die Enzymmenge, welche unter den Bedingungen dieses Versuches die vorhandene l-Peptidmenge in 1 Stunde zur Hälfte spaltet, bezeichnet Willstätter als Erepsineinheit. „Sie ist beispielsweise in 3,4 ccm des hier verwendeten Autolysates (aus 0,4 g Hefetrockengewicht) enthalten. Es handelt sich auch hier um eine scheinbare Enzymmenge, denn die gemessene enzymatische Wirkung ist von Begleitstoffen in wechselndem Masse beeinflusst."

Zur Wirksamkeitsbestimmung zieht Verf. ein optisch inaktives Dipeptid vor. Bezüglich der Erepsin-Einheit sei auch auf die Arbeiten von Waldschmidt-Leitz[1] verwiesen; vgl. auch S. 408.

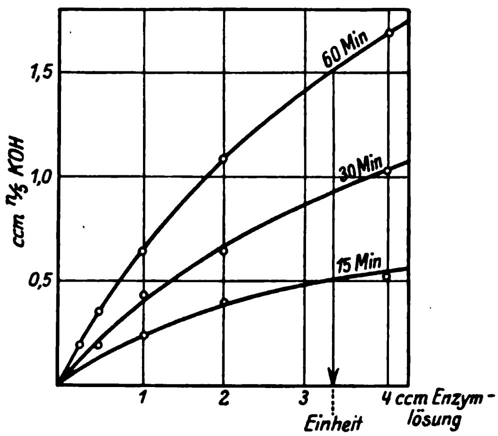


Fig. 48.
Wirkung der Hefenpeptidase auf Leucylglycin.
Enzymmenge und Umsatz.

Waldschmidt-Leitz und Deubsch haben die Kinetik der Milzpeptidase untersucht. Dieselbe erinnert an diejenige der Hefenpeptidase: der Reaktionsverlauf zeigt in einem grösseren Bereich Proportionalität zwischen Zeit und Umsatz, abweichend von der Wirkungsweise des Darmerepsins. (Vgl. in der genannten Arbeit die Kritik der Versuche von Hedin, auf die wir im 21. Kapitel zurückkommen.)

Neutralsalzwirkungen (vgl. S. 411): Die älteren Versuche und Angaben von Koelker (Jl Biol. Chem. 8), Abderhalden (H. 59) und Dernby (Biochem. Zs 81) bedürfen im Lichte der neueren Untersuchungen über Peptidasen einer Revision.

Sehr bemerkenswerte Resultate über Gleichgewichte vom Typus Glycylglycin-Glycinanhydrid haben Levene und Simms[2] erhalten; siehe Nachtrag.

2. Einfluss der Substratkonzentration.

Der Einfluss der Substratkonzentration auf die Geschwindigkeit der Glycylglycin-Spaltung wurde in einer neuen Arbeit von Euler und Josephson[3] untersucht. Die Versuchsreihe, mit einem durch Alkoholfällung eines Glycerinextraktes aus Schweinedarm dargestellten Präparat von Gl f = 0,12 (über die Bedeutung von Gl f siehe S. 408) ausgeführt, wird in der nachstehenden Tabelle wiedergegeben.

[1] Waldschmidt-Leitz und Schäffner, H. 151, 81 und zw. 44; 1926.
[2] Levene und Simms, Jl Biol. Chem. 62, 711; 1925.
[3] Euler und Josephson, Chem. Ber. 59, 226 (1926).

Aktivitäts-[S]-Kurve der Glycylglycin-Spaltung. pH = 8,0. Zu jedem Versuch 2 ccm Enzymlösung. Volumen des Reaktionsgemisches = 25 ccm.

Konzentration des Glycylglycins [S]	Min.	ccm n/5-NaOH Diff.	k × 10⁴	k × 10⁴ [S]
0,025-n.	0	—	(9,6)	0,24
	60	0,07	8,8	
	120	0,12	7,9	
	180	0,16	7,3	
	8	0,61	—	
0,050-n.	0	—	(9,5)	0,47
	60	0,14	8,5	
	120	0,23	7,2	
	180	0,30	6,5	
	∞	1,27	—	
0,10-n.	0	—	(5,6)	0,56
	60	0,17	5,2	
	120	0,30	4,7	
	180	0,41	4,4	
	∞	2,48	—	
0,20-n.	0	—	(3,5)	0,70
	60	0,23	3,4	
	120	0,44	3,3	
	180	0,63	3,2	
	∞	5,00	—	
0,30-n.	0	—	(2,7)	0,81
	60	0,26	2,5	
	120	0,47	2,3	
	180	0,66	2,2	
		7,49		

Die auf Grund dieser Zahlen konstruierte Aktivitäts-[S]-Kurve der Glycylglycin-Spaltung findet man in der Fig. 49. Sucht man aus dem Verlauf dieser Kurve in ähnlicher Weise wie bei anderen Enzymen die Affinitätskonstante der Glycylglycin-Peptidaseverbindung zu schätzen, so findet man für die Schweinsdarmpeptidase den angenäherten Wert $K_M = 15$. Es wird von erheblichem Interesse sein, gerade bei diesem proteolytischen Enzym die Abhängigkeit der Affinität von der Herkunft und Vorgeschichte des Enzyms zu verfolgen.

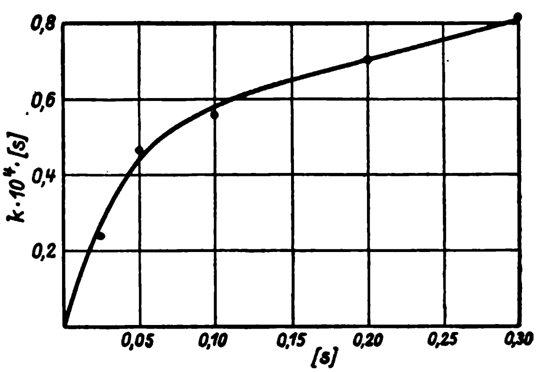


Fig. 49.
Aktivitäts-[S]-Kurve der Glycylglycin-Spaltung pH = 8,0.

3. Einfluss der Enzymkonzentration.

Orientierende Versuche des Verfassers[1] an Glycylglycin und Pankreaserepsin ergaben eine recht angenäherte Proportionalität zwischen relativer Enzymkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit.

Zum gleichen Ergebnis, Proportionalität zwischen Enzymkonzentration E (in einem gewissen Bereich) und Reaktionskonstante, kam Dernby[2] unter Verwendung von Darmerepsin, während Abderhalden und Fodor davon abweichende Resultate anführen (Fermentf. 1, 579).

In Übereinstimmung mit Verf. und mit Dernby finden nun Waldschmidt-Leitz und Schäffner[3] mit Darmpeptidase in einem gewissen Bereich von E Proportionalität zwischen E und k.

Wir lassen einen zusammenfassenden Auszug aus ihrer Tabelle (l. c. S. 42) folgen:

Enzymmenge E	Reaktionskonstante $k \cdot 10^4$
8 ccm	8,7
4 ccm	4,2
2 ccm	1,6
(1 ccm)	(0,25)

„Nur bei der Wirkung sehr kleiner Enzymmengen wird diese Beziehung (Proportionalität) nicht mehr beobachtet; hier findet man die Enzymwirkung verhältnismässig geringer“. „Diese Abweichungen mögen auf den Einfluss der Enzymzerstörung zurückzuführen sein“.

4. Hemmung der Erepsinwirkung durch Glykokoll und andere Reaktionsprodukte der Peptidspaltungen.

Die älteren Angaben über die Nichtbeeinflussung der Erepsinwirkung durch das Spaltungsprodukt der Glycylglycinspaltung, Glykokoll, konnten Euler und Josephson bei ihren neuen Versuchen[4] nicht bestätigen. Es hat sich nämlich gezeigt, dass die Hemmung der enzymatischen Glycylglycinspaltung durch die besprochene Aminosäure in hohem Masse von der Acidität bzw. Alkalinität abhängt. Während isoelektrisches Glykokoll keine Wirkung auf die Erepsinwirkung auszuüben scheint, wurde beim optimalen pH der Glycylglycinspaltung (pH = 7,9—8) eine Hemmung beobachtet.

---

[1] Euler, Sv. Vet. Arkiv f. Kemi 2, Nr. 39, S. 7; 1907.
[2] Dernby, Biochem. Zs 81, 107 u. zw. 185; 1917.
[3] Waldschmidt-Leitz und Schäffner, H. 151, 31; 1925/26.
[4] Euler und Josephson, Chem. Ber. 59, 226; 1926. — H. 157, 122; 1926.

0,1 m Glycylglycin

Min.	pH	Zunahme des Alkaliverbrauchs. ccm n/5 $Ba(OH)_2$
10	7,9	—
50	—	0,50
65	—	0,65
150	8,45	1,09

0,1 m Glycylglycin + 0,2 n Glykokoll

Min.	pH	Zunahme des Alkaliverbrauchs. ccm n/5 $Ba(OH)_2$
12	7,9	—
50	—	0,24
65	—	0,29
150	8,1	0,52

Die Reaktionsgeschwindigkeit war also bei diesem Versuch durch den Zusatz von 0,2 m Glykokoll auf rund die Hälfte der Reaktionsgeschwindigkeit herabgesetzt, die bei Spaltung von 0,1 m Glycylglycin in Abwesenheit von Glykokoll beim Versuchsbeginn eintritt.

Die folgende Versuchsreihe zeigt den Einfluss der Alkalinität.

0,1 m Glycylglycin

pH = 7,84 bei Versuchsbeginn	
Min.	Zunahme des Alkaliverbrauchs. ccm n/5 $Ba(OH)_2$
20	0,22
45	0,36
60	0,41

0,1 m Glycylglycin + 0,2 m Glykokoll

pH =	7,09	7.61	7,87	8,16	8,44
Min.	Zunahme des Alkaliverbrauchs ccm n/5 $Ba(OH)_2$				
70	0,30	0,25	0,21	0,11	0,0
180	0,63	0,46	0.44	0,25	0,02
280	0,76	0,52	—	—	—

Ähnliche Verhältnisse findet man bei Alanin wieder. Hemmung durch l-Alanin: Abderhalden und Fodor (Fermentf. 1). — Euler und Josephson haben experimentell festzustellen versucht, ob die Hemmung der Peptidase durch die Spaltprodukte der Dipeptide auf eine Affinität zwischen Enzym und Aminosäure zurückgeführt werden kann, welche durch die substratbindende Gruppe des Enzyms vermittelt wird, und eine solche Affinität scheint sich nach unseren Versuchen (H. 157, 122) wirklich geltend zu machen. Glycylanhydrid und Harnstoff hemmen nicht. Acetursäure, Hippursäure und Benzoylglycylglycin wurden durch unser Darmerepsin-Präparat nicht gespalten[1].

„Aus diesen Versuchen ziehen wir den Schluss, dass die Bindung eines Substrates an das Erepsin aus Schweinsdarm wenigstens zum Teil durch eine freie Aminogruppe des Substrates vermittelt wird. Inwiefern auch andere Gruppen im Substrat für die Bindungsfähigkeit an das Enzym mitbestimmend sind, lässt sich noch nicht sagen. Jedenfalls scheinen uns die Ergebnisse über die Spaltbarkeit der Curtiusschen Biuretbase

[1] Dadurch werden frühere Angaben bestätigt, und zwar: bezgl. Hippursäure solche von Clementi, Atti Accad. dei Lincei (5) 32, 172; 1923. Bezgl. Benzoylglycylglycin diejenigen von Toru Imai, H. 136, 205; 1924.

$$H_2N \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot NH \cdot CH_2 \cdot COOC_2H_5$$

dafür zu sprechen, dass eine freie Carboxylgruppe im Substrat für die Bindung und Spaltung des Substrates nicht notwendig ist."

G. Spezifität der Peptidasewirkungen.

1. Verschiedene Substrate.

Die Aufklärung der Spezifität der eigentlichen Peptidasen ist einer der wichtigsten Punkte in der gegenwärtigen Proteaseforschung. Erst nachdem die Zahl und die Wirkungsbereiche der am Eiweissabbau beteiligten Komponenten festgelegt sind, können wir uns ein Bild von den proteolytischen Funktionen der einzelnen Organe machen. Es ist ein grosses Verdienst von Willstätter und von Waldschmidt-Leitz, den Grund zu der Scheidung der proteolytischen Enzyme gelegt und bereits wichtige Tatsachen zur Beurteilung der Reichweite der einzelnen Enzyme aufgedeckt zu haben.

Was zunächst die Frage betrifft, ob diejenigen Enzyme, welche Dipeptide in den einzelnen Organen spalten, also besonders Pankreaspeptidase und Darmpeptidase charakteristische Besonderheiten aufweisen oder nicht, so führen wir aus der Arbeit von Waldschmidt-Leitz und Schäffner (H. 151) folgende Tabelle an:

— bedeutet keine nachweisbare Hydrolyse; + bedeutet positive Hydrolyse.

Substrat	Enzym		
	Darm-erepsin	Pankreas-erepsin	Pankreas-trypsin (akt.)
Alanylglycin	+	+	—
Glycyltyrosin	+	+	—
Glycylglycin	+	+	—
Leucylglycin	+	+	—
Leucylalanin	+	+	—
Pepton (ex. albumine, Merck)	—	—	+
Clupein	—	—	+
Thymushiston	—	—	+
Casein	—	—	+
Fibrin	—	—	+
Gelatine	—	—	+
Gliadin	—	—	+
Zein	—	—	+
Eieralbumin	—	—	+
Ricinus-globulin	—	—	+

„Der qualitative Vergleich der Spezifität des intestinalen und des pankreatischen Erepsins, den die Tabelle wiedergibt, belässt für eine Verschiedenheit der beiden Enzyme, wie sie auf Grund der älteren Angaben von E. Fischer

und E. Abderhalden[1] „Über das Verhalten verschiedener Polypeptide gegen Pankreassaft" anzunehmen war, keine Stütze; aber auch die quantitativen Belege, die . . . für die Reihenfolge der Spaltbarkeit der verschiedenen Peptide und für das Verhältnis der jeweiligen Reaktionsgeschwindigkeiten angeführt werden, bieten keine Anhaltspunkte für eine solche Annahme . . . . Es kommt hinzu, dass sowohl das Adsorptionsverhalten der beiden Enzyme gegen Tonerde wie auch die Abhängigkeit ihrer Aktivität von der Wasserstoffzahl . . übereinstimmend gefunden wird. Es ist daraus zu folgern, daß für eine Verschiedenheit der beiden Enzyme, des Darmerepsins und des Pankreaserepsins nun keine Anhaltspunkte mehr vorliegen, dass sie vielmehr als identisch zu betrachten sind[2].

Fischer und Abderhalden[3] hatten die Peptide in durch Pankreassaft hydrolysierbare und nicht hydrolysierbare geschieden; ihre seither oft zitierte Tabelle ist auch im ersten Teil dieses Werkes (3. Aufl., S. 347) wiedergegeben.

Die neueren Ergebnisse der Willstätterschen Schule, besonders diejenigen von Waldschmidt-Leitz haben nun die Beurteilung dieser älteren Angaben geändert. Offenbar war das von Fischer und Abderhalden verwendete Enzymmaterial, das von St. Petersburg bezogen war, ereptisch nur noch wenig wirksam und büsste dann im Verlauf der Versuche seine Aktivität noch weiter ein; diese Annahme mag neben der noch unvollkommen entwickelten und ungleichmässigen enzymatischen Methodik die bestehenden Abweichungen erklären.

Mit einem proteolytisch einheitlichen, kräftigen Pankreaserepsin sind von Waldschmidt-Leitz und Harteneck[4] folgende Zahlen gewonnen worden:

Peptidhydrolyse durch Pankreaserepsin.

Peptid	Spaltung in 2 St. bei 30°. ccm 0,2 n- KOH
Alanylglycin	2,28
Glycyltyrosin	0,39
Glycylglycin	0,15
Glycylalanin	0,45
Leucylglycin	1,07
Leucylalanin	0,12

Einen weiteren Fortschritt bringt die folgende Tabelle von Waldschmidt-Leitz und Schäffner (H. 151, 54) insofern, als sie das Verhältnis der Reaktionsgeschwindigkeiten, welche für die Hydrolyse der einzelnen Peptide gefunden wurde, angeben; das Verhältnis ist, wie die Tabellen zeigen, innerhalb der Fehlergrenzen konstant. „Es ist anzunehmen, dass auch die

[1] Fischer und Abderhalden, H. 46, 52; 1905.

[2] An diese Schlussfolgerung haben E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck (H. 147, 286 u. zw. 307, 1925) eine weitergehende physiologische Fragestellung geknüpft und erörtert; es ist nämlich damit zu rechnen, dass die primäre Bildung auch des Darmerepsins sich in der Pankreasdrüse vollzieht und dass seine Absonderung durch die Darmschleimhaut auf eine sekundäre Anhäufung in deren Drüsenzellen zurückzuführen ist. Wir werden auf diese interessante Frage im 3. Teil dieses Buches zurückkommen.

[3] Fischer und Abderhalden H. 46, 52. 1905.

[4] Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 149, 203 u. zw. 216; 1925.

genauere Bestimmung der Affinitätsverhältnisse bei beiden Enzymen ... ihre Identität bestätigen und vertiefen wird; damit würde eine exakte Grundlage gegeben sein für eine Identifizierung der für die Mengen der beiden Enzyme gewählten Masse."

Es scheint somit berechtigt, die in dieser Monographie verwendete Einheit der Wirksamkeit Gl f für die Pankreaspeptidase und für die Darmpeptidase anzunehmen und aus diesen Werten die relativen Mengen der beiden Enzyme (unter Vorbehalt für gleiche Affinität) zu vergleichen.

„Das zu den in der Tabelle mitgeteilten Versuchen angewandte Verhältnis der Enzymmengen betrug, wie der Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten erkennen lässt, etwa 2:1; man liess 3,00 ccm Elution aus Tonerde-Adsorbat, gewonnen aus Darmschleimhaut bzw. 2,00 ccm Tonerdeelution, bereitet aus frischer Pankreasdrüse 1 bzw. 2 Stunden bei 30° und pH = 7,8 auf 0,001 Mol des Peptids einwirken."

Peptidhydrolyse durch Darm- und Pankreaserepsin.

Substrat	Darmerepsin		Pankreaserepsin		$k_1 : k_2$
	Aciditätszunahme ccm 0,2 n-KOH	k_1 (monomolek.) ber.	Aciditätszunahme ccm 0,2 n-KOH	k_2 (monomolek.) ber.	
Alanylglycin . . .	2,48	0,0048	2,28	0,00222	2,2 ± 0,07
Leucylglycin . . .	1,12	0,0018	1,07	0,00087	2,1 ± 0,13
Glycyltyrosin . . .	0,41	0,00061	0,39	0,00030	2,0 ± 0,30
Glycylglycin . . .	0,65	0,0010	0,15	0,00011	9,1
„ . . .	0,84	0,00133	0,66	0,00051	2,6 ± 0,20
„ . . .	0,90	0,00144	0,77	0,00061	2,4 ± 0,16
Leucylalanin . . .	0,15	0,00021	0,12	0,00009	2,3 ± 1,0

Auch insofern wurde von Waldschmidt-Leitz die Identität zwischen Pankreas- und Darmerepsin nachgewiesen, als sich beide übereinstimmend gegen Proteine und deren höhere Spaltprodukte inaktiv erwiesen.

Nicht gespalten werden:	Pepton (Merck ex. alb.)	Gliadin
	Clupeinsulfat	Zein
	Thymushiston	Eieralbumin
	Casein; Fibrin	Ricinusglobulin.

2. Trennung von Pankreastrypsin und Pankreaserepsin.

Zu der vorletzten Spalte der obigen Tabelle ist folgendes über die Trennung der Trypsins von Erepsin (der Peptidase) in Ergänzung der kurzen Angaben über die Reinigung der Peptidase hinzuzufügen:

G. Schaeffer und E. Terroine[1] hatten angegeben, durch Dialyse von Pankreassaft gegen destilliertes Wasser eine Trennung der beiden Proteasen erzielt zu haben. Nach Waldschmidt-Leitz lassen sich indessen diese Erscheinungen auf andere Ursachen zurückführen. Sie fanden, dass bei der Dialyse keine Trennung der enzymatischen Komponenten eintritt, „man beobachtet vielmehr eine allmähliche und gleichmässige Zerstörung beider Enzyme.“

Waldschmidt-Leitz und Harteneck haben dann die Trennung der beiden Pankreasproteasen auf Grund ihres verschiedenen Adsorptionsverhaltens gegenüber Tonerde durchgeführt.

Pankreastrypsin wird nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz[2] in den angesäuerten Auszügen der Pankreasdrüse durch Tonerde nur in geringem Masse, bei neutraler Reaktion in viel höherem Grade aufgenommen. Hingegen wird die Adsorption der Peptidase durch die Tonerde in saurer Lösung, beispielsweise bei pH = 4,7, begünstigt, in neutralem Medium aber zurückgedrängt. Diese Unterschiede in den Adsorptionsaffinitäten benutzt das eingeschlagene Verfahren zur Isolierung der enzymatischen Komponenten; sie bewirken, dass nach mehrmaliger, z. B. dreimaliger Wiederholung der Adsorptionsvornahme die Mutterlauge frei von Erepsin gefunden wird, während in den Elutionen der Adsorbate, beispielsweise mit verdünntem Ammoniak oder auch mit Alkaliphosphat das Erepsin angereichert wird, ohne dass sich in ihnen tryptische Wirkung nachweisen liesse.

Auf Grund der neuesten Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz[3] lassen sich nun Trypsin und Peptidase schärfer voneinander unterscheiden als man vorher angenommen hatte. Die Hinweise, die sich aus der Gegenüberstellung in der obigen Tabelle auf strukturelle Besonderheiten der spezifischen Substrate des Trypsins ergeben, erlauben die Feststellung, dass die beispielsweise in den Peptonen der Pepsinverdauung, in den Protaminen und Histonen oder in anderen geprüften Proteinen vorliegenden strukturellen Gruppierungen vom Typus der für Erepsin spezifischen einfachen Peptidbindungen verschieden sein werden.

Der ganz neuerdings von Waldschmidt-Leitz[4] erreichte Fortschritt in der Trennung von Trypsin und Peptidase wurde ermöglicht durch die Verwendung besonderer, wohl definierter Tonerdesorten. Frisch bereitetes Aluminiumhydroxyd von der Zusammensetzung $Al(OH)_3$ (Sorte C) erfährt, wie Willstätter, Kraut und Erbacher[5] gefunden hatten, bei der Aufbewahrung in wässriger Suspension eine Umwandlung, die auch sein chemisches Verhalten

[1] Schaeffer und Terroine, Jl de Physiol et Pathol. gén. 12, 905; 1910. — Siehe auch Zunz, Arch int. de Physiol. 11, 191; 1912.

[2] Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 125, 132 u. zw. 174; 1922/23.

[3] Waldschmidt-Leitz und Schäffner, H. 151, 31; 1926.

[4] Waldschmidt-Leitz, Schäffner und Grassmann, H. 156, 68; 1926.

[5] Willstätter, Kraut und Erbacher, Chem. Ber. 58, 2448; 1925.

ändert; es geht nämlich die instabile α-Modifikation über eine Zwischenstufe Cβ in das stabile Gel Cγ über. Zur Gewinnung der einheitlichen Pankreasproteasen wie des trypsinfreien Darmerepsins wandten Waldschmidt-Leitz und seine Mitarbeiter die Tonerdesorte Cγ an[1].

Versuch 1. Verhalten gegen Tonerde Cγ. 20 ccm Glycerinauszug aus frisch getrockneter Pankreasdrüse von Schweinen wurden nach dem Verdünnen mit 20 ccm Wasser + 1,50 ccm Acetatpuffer von pH = 3,8 viermal der Adsorption mit je 1,5 ccm Tonerdesuspension Cγ (= je 52,5 mg Al_2O_3) unterworfen; die vereinigten Absorbate, die zweimal mit 20 ccm 20%igem Glycerin (durch Acetatpuffer auf pH = 3,8 eingestellt) gewaschen waren, eluierte man mit 40 ccm 0,04 n-NH_3 (20% Glycerin enthaltend), während man die Adsorptionsrestlösung mit n-NH_3 neutralisierte. Die Restlösung enthielt dann 60% vom angewandten Trypsin und 2,5% vom Erepsin und die Elution 25 bzw. 30%; der Erepsingehalt der Elution war infolge Enzymzerstörung zu gering.

Versuch 2. Verhalten gegen Tonerdesorte AlO·OH. 20 ccm Glycerinauszug, mit 20 ccm Wasser + 1,5 ccm n.-Acetatpuffer von pH = 3,8 verdünnt, wurde viermal mit je 1,0 ccm Tonerdegel von der Zusammensetzung AlO.OH (= je 52,0 mg Al_2O_3) adsorbiert; hierauf wurden die vereinigten, wie in Versuch 1 gewaschenen Adsorbate mit 40 ccm 0,04 n-NH_3 (20% Glycerin enthaltend) eluiert. Der Gehalt der Restlösung belief sich auf 45% vom angewandten Trypsin und auf 77% vom Erepsin, während die Elution 47 bzw. 15% davon enthielt. Vom ereptischen Enzym war in diesem Fall nur wenig, vom tryptischen aber etwas mehr aufgenommen worden, die Adsorbierbarkeit der beiden Enzyme war also vertauscht.

3. Zusammenwirkung proteolytischer Enzyme.

In engster Beziehung zu der Klärung des spezifischen Wirkungsbereiches der einzelnen Komponenten des eiweiss-spaltenden Enzymsystems steht die Erforschung des Zusammenwirkens der drei Grundtypen, Pepsin, Trypsin und Erepsin. Nach den verdienstvollen orientierenden Versuchen von Henriques und Gjaldbaek[2] über die Einzelleistungen des Pepsins und des Trypsins auf Proteine wie Casein verdankt man Waldschmidt-Leitz und seinen Mitarbeitern bereits wertvolle Beobachtungen, welche, über das enzymchemische Interesse hinausgehend, ein tieferes Eindringen in die Chemie der Proteine ermöglichen werden. Es ist deshalb vielleicht nicht ungeeignet, diesen Abschnitt mit einem Auszug aus der Erörterung abzuschliessen, welche Waldschmidt-Leitz und Simons[3] einer ihrer neuesten Arbeiten voranstellen.

„Es hat sich am Beispiel des Caseins erwiesen, dass bei der fraktionierten Hydrolyse durch Pepsin und durch das erepsinfreie Trypsin die Wirkungen der beiden Enzyme, gemessen an dem in alkoholischer Lösung ermittelten Zuwachs an Carboxyl, unabhängig von der Reihenfolge ihrer Einwirkung beobachtet werden. Die quantitative Übereinstimmung der enzymatischen Einzelwirkungen belässt für eine Vertretbarkeit der beiden Enzyme,

---

[1] Wie die genannten Forscher mit Recht hervorheben, ist es eine schöne Bestätigung für die chemische, nicht für die kolloidchemische Funktion von Adsorbentien, wenn es sich zeigt, dass mit dem Wechsel in der chemischen Zusammensetzung von $Al(OH)_3$ zu AlO.OH eine wesentliche Veränderung der selektiven Adsorptionswirkung verbunden ist.

[2] Henriques und Gjaldbaek, H. 75, 363; 1911. — 83, 83; 1912/13.

[3] Waldschmidt-Leitz und Simons, H. 156, 99; 1926.

von Pepsin und Trypsin, keine Anhaltspunkte. Es ist indessen mit der aufeinanderfolgenden Anwendung der getrennten, einheitlichen Pankreasproteasen, des Trypsins und des Erepsins, möglich gewesen, die schönen Beobachtungen von Henriques und Gjaldbaek in einem anderen Sinne zu bestätigen und zu vertiefen; an dem erschöpfend mit Trypsin und mit Erepsin gespaltenen Substrat findet man für das peptische Enzym keine deutliche Wirkung mehr. Diese Tatsache, dass die spezifische Wirkung des Pepsins nach tryptischer Vorverdauung quantitativ erhalten bleibt, dass sie hingegen nach einer kombinierten Hydrolyse durch Trypsin und Erepsin nicht mehr wahrgenommen wird, weist darauf hin, dass die vorausgehende Einwirkung des Erepsins zu einer Verarmung an Pepsinsubstraten führen und dass die besondere Aufgabe des peptischen Enzyms je nach dem Grade der Vorverdauung durch die Mitwirkung der ereptischen entfallen kann. Diese Feststellung die für die Beurteilung der spezifischen Funktion des Pepsins wie für die Erkenntnis der Proteinstruktur von Bedeutung wäre, wird, wenngleich sie durch die Beobachtungen von Henriques und Gjaldbaek gestützt sein mag, auf breiterer Grundlage zu bestätigen sein; sie liess erkennen, dass . . . auch die spezifische Einstellung des Pepsins mehr durch eine besondere Konfiguration der Proteinbausteine oder durch die Größe des Moleküls als durch eine spezifische Bindungsart bestimmt zu sein scheint“.

In nachstehender Tabelle stellt Waldschmidt-Leitz die Versuchsergebnisse übersichtlich zusammen:

Enzymatische Wirkung und Reihenfolge.

(Die Angaben beziehen sich auf die Hydrolyse von 0,30 g Casein).

Nr.	Reihenfolge der Enzyme	Acid.-Zuwachs ccm 0,2 n. KOH	Nr.	Reihenfolge der Enzyme	Acid.-Zuwachs ccm 0,2 n. KOH
1	Pepsin	2,20	3	Trypsin-Kinase .	4,54
	Trypsin-Kinase .	4,33		Erepsin	4,36
	Erepsin	+		Pepsin	0,22
2	Trypsin-Kinase .	4,54	4	Pepsin	2,20
	Pepsin	2,40		Trypsin	2,02
	Trypsin-Kinase .	2,50		Trypsin-Kinase .	+
	Erepsin	2,22		bzw. Erepsin . .	+

„Es könnte nach den angeführten Beobachtungen scheinen, dass die besonderen Aufgaben der einzelnen Proteasen bei der Hydrolyse der Proteine nicht deutlich genug zu unterscheiden wären; für eine Abgrenzung ihrer besonderen Wirkungen, etwa auf die Spaltung bestimmter Aminosäurekomplexe oder bestimmter Strukturen fehlt uns noch jeder Anhalt. Eine allgemeinere Kennzeichnung der besonderen enzymatischen Funktionen ergibt sich indessen aus wichtigen Erfahrungen der Literatur. Wenn unter der Wirkung des

Pepsins, wie man annimmt, und wie wir bestätigen können, und ähnlich bei der Einwirkung des nichtaktivierten Trypsins[1] das Molekül der Proteine nur in grössere Bruchstücke zerfällt, erkennbar an einem verhältnismässig nicht bedeutenden Zuwachs an Peptidcarboxylen, während andererseits zufolge E. Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck die Wirkung des aktivierten erepsinfreien Trypsins überwiegend in der Loslösung freier Aminosäuren zur Geltung kommt und wenn endlich, wie Waldschmidt-Leitz und Harteneck gezeigt haben, der Angriff des Erepsins nur einfache Peptide betrifft, so erlauben diese Tatsachen eine prinzipielle Unterscheidung dieser vier enzymatischen Funktionen, unabhängig von ihrer noch nicht erkannten strukturellen Spezifität. So wird es auch verständlich, dass, wie aus Versuch 2 der Tabelle hervorgeht, die peptische Hydrolyse tryptischer Verdauungsprodukte für die Wirkung des tryptischen Enzyms wiederum Angriffspunkte freizulegen vermag; es mag von der Grösse der noch vorhandenen Komplexe, wenn nicht von einer besonderen strukturellen Anordnung ihrer Bausteine abhängen, ob zu ihrem weiteren Abbau die Mitwirkung des Trypsins erforderlich ist."

H. Stabilität der Peptidase. — Einfluss der Temperatur auf die Dipeptidspaltung.

Versuche über die Temperatur-Stabilität, also über die Grösse der Konstanten k_e bei verschiedenen Temperaturen (vgl. I. Teil, 3. Auflage, S. 246) liegen noch nicht vor. Siehe auch Euler, H. 51, 213; 1906.

Was die Beständigkeit der Peptidase bei mittlerer Temperatur, etwa 30°, betrifft, so liefern die älteren Versuche[2] keine zuverlässigen oder eindeutigen Anhaltspunkte. — An frischen Organsäften sind gelegentlich Zunahmen der Wirksamkeit beobachtet worden.

Enzymatische Wirkung und Alter der Drüse.

Substrat	Pankreasprobe. Angaben in ccm 0,2 n-KOH			
	2½ Jahre alt	frisch best.	XXIV	
			frisch	n. 1 Mon. best.
Gelatine	1,28	1,33	1,40	1,29
Leucylglycin	0,39	1,17	1,06	0,70
Alanylglycin	0,27	0,80	0,77	—
Glycylglycin	0,05	0,30	0,24	0,14
Leucylalanin	0,09	0,21	0,08	—

[1] Siehe dazu Waldschmidt-Leitz, Schäffner und Grassmann, H. 156, 68; 1926.
[2] Vernon, Jl of Physiol. 30, 330; 1903. — K. Mays, H. 49, 124; 1906.

Nach **Waldschmidt-Leitz** und A. **Harteneck**[1] lässt sich die Beständigkeit des pankreatischen Erepsins von der des tryptischen Enzyms, z. B. in den rohen Präparaten unterscheiden, und zwar ist sie weniger ausgeprägt. Dies ergibt z. B. der Vergleich von frisch getrocknetem Drüsenmaterial mit gealterter Trockensubstanz oder auch die Verfolgung der speziellen Wirkung bei der Aufbewahrung von Glycerinauszügen der Drüse. Bei verschiedenen Versuchen ergaben sich wechselnde Beständigkeiten; siehe Tabelle auf S. 426.

Den Einfluss der Temperatur auf die Spaltungsgeschwindigkeit von Glycyl-l-tyrosin durch Hefepresssaft und Pankreassaft sowie von dl-Leucylglycin durch Hefepresssaft haben **Abderhalden**, **Caemmerer** und **Pincussohn**[2] polarimetrisch untersucht. Die Reaktionskonstanten sind daselbst nicht berechnet. Wir führen die Originalzahlen an, welche zeigen, dass sie sich zu einer Berechnung von k_c kaum verwenden lassen. Die neben den Versuchszeiten gegebenen Zahlen sind die abgelesenen Winkel.

Zu allen Versuchen 1 ccm dl-Leucylglycin-Lösung.

Minuten	15° 1,1 ccm Hefesaft 4,5 ccm Wasser	25° 1,0 ccm Hefesaft 4,5 ccm Wasser	35° 1,0 ccm Hefesaft 4,5 ccm Wasser	45° 1,0 ccm Hefesaft 4,5 ccm Wasser
0	0,00°	0,00°	0,00°	0,00°
15	0,00	—0,08	—0,06	—0,10
30	—0,01	—0,08	—0,13	—0,20
45	—0,02	—0,12	—0,20	—0,26

[1] Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 147, 286 u. zw. 298; 1925.
[2] Abderhalden, Caemmerer und Pincussohn, H. 59, 293; 1909.

17. Kapitel.

Beobachtungen über enzymatische Spaltung von Peptonen und höheren Polypeptiden.

Nachdem im 16. Kapitel die Peptidasen behandelt wurden, welche nach den Ergebnissen der Münchener Schule und besonders nach den Arbeiten von Waldschmidt-Leitz durch ihre Wirkung auf Dipeptide — nicht durch ihre Peptonspaltung — zu charakterisieren sind[1], bleiben zahlreiche und teilweise wertvolle Beobachtungen übrig, welche mit Enzym-Material verschiedener Herkunft an Peptonen gewonnen worden sind. Nach unseren gegenwärtigen Kentnissen dürften diese Enzymlösungen Peptidasen, aktiviertes und nicht aktiviertes Trypsin und vielleicht noch ein Enzym vom Papain-Typus enthalten haben. Das ungleiche Mischungsverhältnis der Komponenten und die zuweilen gänzliche Abwesenheit einer derselben macht mehrere früher auffallende Beobachtungen verständlich[2]. Näher wird sich die Zusammensetzung der in älteren Arbeiten verwendeten Enzymsäfte nicht mehr ermitteln lassen, und manche Frage bedarf somit auf Grund der neu gewonnenen Grundlage einer neuen Bearbeitung. Aber andererseits liegt in diesem hier kurz zu referierenden Material doch viel für die angewandte und für die forschende Enzymchemie Brauchbares, wenn auch die gewonnenen Ergebnisse ihren quantitativen Charakter verloren haben, da es sich stets um

---

[1] Auch Abderhalden (H. 151, 151; 1926) erkennt die Ergebnisse von Waldschmidt-Leitz als beweisend an, „dass Erepsin alle von ihm untersuchten Dipeptide spaltet, wogegen keines davon von dem tryptischen Ferment angegriffen wird". Auch ein Tripeptid wurde von letzterem nicht hydrolysiert. Ferner konnte gezeigt werden, dass weder Pepton, das der peptischen Verdauung entstammt, noch Protamin, noch Histon, noch irgend ein anderes Protein durch Erepsin gespalten wird. Alle genannten Produkte werden dagegen von Trypsin hydrolysiert. Es steht somit einwandfrei fest, dass Erepsin und Trypsin zwei ganz verschiedene Fermentkomplexe darstellen. Sie sind auf bestimmte Substrate eingestellt."

Immerhin scheint Abderhalden insofern von der Auffassung von Waldschmidt-Leitz abzugehen, als er die Spaltung hoher Polypeptide durch Erepsin für nachgewiesen bzw. möglich hält. Er schreibt in der gleichen Mitteilung: „Einfügen möchte ich noch, dass auch aus einer grossen Anzahl von Aminosäuren aufgebaute Polypeptide von Erepsin gespalten werden. Das von Fodor (Abderhalden und Fodor, Chem. Ber. 49, 561; 1916) und mir dargestellte, 19 Aminosäuren enthaltende Polypeptid wird auch zerlegt..."

[2] Siehe z. B. U. Lombroso und Lattes, Arch. di Fisiol. 10, 462; 1910. — Arch. di Farm. 13, 186.

eine Mehrheit von Substraten und Katalysatoren, also um mehrere neben einander verlaufende Reaktionen handelt.

Ferner sind hier zu behandeln die Beobachtungen und Messungen über die Spaltung von Peptiden mit drei und mehr Aminosäureresten; über die Einheitlichkeit des dabei wirksamen Enzyms lässt sich noch nichts Endgültiges sagen. Die Spezifität der Peptidasen auf Dipeptide möchten Josephson und Verfasser[1] einstweilen als eine relative bezw. graduelle ansehen.

A. Substrate.

Wir haben im 16. Kapitel, der Auffassung von Waldschmidt-Leitz folgend, die Dipeptide als die spezifischen Substrate der Peptidase bzw. der Peptidasen behandelt, dabei allerdings die Möglichkeit betont, dass diese Spezifität relativ ist, dass also wenigstens die Tri- und Tetrapeptide noch vom gleichen Enzym mit einer noch messbaren, freilich viel geringeren Geschwindigkeit angegriffen werden.

Wir ziehen also bis auf weiteres eine Grenze vor den Tripeptiden und behandeln diese als Substrate zusammen mit allen höheren Peptiden und den Peptonen.

1. Peptide.

Wie die Kenntnis der Dipeptide so verdankt man bekanntlich Emil Fischer auch die Kenntnis der meisten höheren Glieder dieser Körperklasse und der zu ihnen führenden Synthesen. Die von E. Fischer eingehend durchgearbeitete und beschriebene Reihe der Polypeptide beginnt mit dem Diglycylglycin[2] und dem Triglycylglycin, dessen Ester, die sog. Biuretbase, von Curtius[3] entdeckt worden war.

Die Reihe von Polypeptiden[4], welche sich bis auf die Glieder mit 18 Aminosäuren[5] und mit 19 Aminosäuren[6] erstreckt, kann hier nicht eingehender beschrieben werden; es sei auf die Originalarbeiten und auf Fischers Zusammenfassung (Chem. Ber. 39) verwiesen.

Was die Struktur der Polypeptide betrifft, so „führen die Resultate der Synthese und alle bisher bekannten Metamorphosen übereinstimmend zum Schluss, dass in ihnen die Aminosäuren amidartig verkuppelt sind".

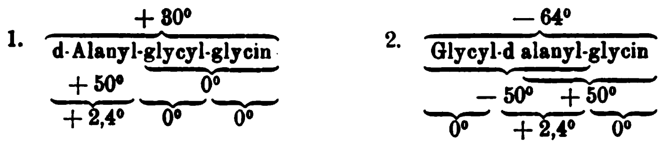
Fischer und Abderhalden[7] verdankt man ferner die ersten Studien über die Spaltung dieser Polypeptide. Diese Arbeiten sind von Abder-

[1] Euler und Josephson: H. 157, 122; 1926.
[2] Fischer, Chem. Ber. 36, 2982; 1903.
[3] Curtius, Chem. Ber. 16, 753; 1883. — 37, 1284; 1904.
[4] Fischer, Leuchs und Suzuki, Chem. Ber. 37, 3310; 1904 (Tripeptide). — Fischer und Suzuki, Chem. Ber. 37, 4577; 1904 (Tetrapeptide). — Fischer, Chem. Ber. 39, 461; 1906 (Heptapeptide). — Chem. Ber. 40, 1754; 1907 (Oktapeptid).
[5] Fischer, Chem. Ber. 40, 1754; 1907.
[6] Abderhalden und Fodor, Chem. Ber. 49, 561; 1916.
[7] Fischer und Abderhalden, H. 46, 52; 1905.

halden und seinen Mitarbeitern in verschiedenen Richtungen fortgesetzt worden [1].

Tripeptide: Mit Tripeptiden hat Abderhalden [2] die Frage in Angriff genommen, „ob die in den verschiedensten Geweben des Tier- und Pflanzenreiches vorhandenen peptolytischen Fermente identisch sind oder aber eine ganz verschiedene Wirkung zeigen“ [3].

„Eine sehr weitgehende Differenzierung der Wirkung verschiedener Fermentlösungen musste sich durch die Verwendung von komplizierter gebauten optisch-aktiven Polypeptiden ermöglichen lassen. Wählen wir als Beispiel das Tripeptid d-Alanyl-glycyl-glycin. Es zeigt in wässriger Lösung $[\alpha]_{20^\circ}^{D} = +30^\circ$. Sein Abbau kann nun in der Weise erfolgen, dass zunächst hauptsächlich d-Alanin abgespalten wird. Es bleibt das Dipeptid Glycyl-glycin übrig. In diesem Fall muss das Drehungsvermögen der Lösung beständig abnehmen, denn Glycylglycin ist optisch inaktiv. Findet dagegen eine Abspaltung von Glycin statt, dann muss sich dieser Verlauf der Hydrolyse an einem Ansteigen des Drehungsvermögens kundgeben, denn das entstehende Dipeptid d-Alanyl-glycin besitzt $[\alpha]_{20^\circ}^{D} = +50^\circ$. Verwenden wir die zu vergleichenden, auf ein bestimmtes Dipeptid eingestellten Fermentlösungen, so können wir durch Benützung derartiger Tripeptide prüfen, ob der Abbau in genau der gleichen Weise verläuft oder nicht.“



Aus ihren Versuchen, die wir hier nicht wiedergeben, schliessen Abderhalden und Brahm, dass die beiden Fermentlösungen (Hefesaft und Darmsaft) die beiden Tripeptide in genau der gleichen Weise abgebaut haben.

Aus seinen Versuchen mit optisch-aktiven Polypeptiden (z. B. dem Pentapeptid dl-Leucyl-triglycyl-glycin zieht Abderhalden (Fermentf. 8, 240) den Schluss, „dass auch aus mehreren Aminosäuren bestehende racemische Polypeptide asymmetrisch gespalten werden, und dass es möglich ist, das entstandene optisch-aktive Polypeptid zu isolieren und zu identifizieren.

Neue Versuche über die racemischen Tripeptide: dl-Alanyl-glycyl-glycin, dl-Leucyl-glycyl-glycin, Glycyl-dl-leucyl-glycin und dl-Leucyl-glycyl-dl-alanin und über ihre Spaltung durch Hefemazerationssaft und Pankreatin haben Abderhalden und Singer [4] angestellt.

Die Spaltung eines Tetrapeptids durch Pankreassaft und durch Hefepresssaft hat G. Caemmerer [5] studiert, die durch Hefesaft Abderhalden [6], der auch ein Pentapeptid in den Kreis der Untersuchung zog.

Gelegentlich einer weiteren Fragestellung, „wie sich ein Polypepetid verhält, an dessen Aufbau neben den in der Natur auftretenden Aminosäureformen ein Baustein, der in der betreffenden Konfiguration im Eiweiss nicht

[1] Siehe Abderhalden, Chem. Ber. 39, 2449; 1916.

[2] Abderhalden und Brahm, H. 57, 342; 1908.

[3] Diese Fragestellung ist einstweilen wohl dadurch erledigt, dass in den verschiedenen Geweben des Tier- und Pflanzenreiches die hier wirksamen Enzyme im allgemeinen in verschiedenen relativen Mengen auftreten, wodurch sich ein verschiedener Spaltungsverlauf der Tri- und Polypeptide ergibt.

[4] Abderhalden und Singer, Fermentf. 8, 187; 1925.

[5] G. Caemmerer, Diss. Giessen, 1911.

[6] Abderhalden, Fermentf. 8, 240; 1925.

vorkommt, enthalten ist", findet man bei Abderhalden und Handovsky[1] wertvolle Beiträge zur Chemie der Polypeptide.

Ferner hat Abderhalden[2] Aminosäuren synthetisch bereitet, die in der Natur bis jetzt nicht aufgefunden worden sind und deren Vorkommen als Eiweissbausteine sehr unwahrscheinlich ist. So wurden die α-dl-Aminoheptylsäure, α-dl-Aminocaprylsäure und α-dl-Aminomyristinsäure dargestellt. Aus Aminosäuren wurden Polypeptide aufgebaut, wobei als weitere Bausteine in der Natur vorkommende Aminosäuren verwendet wurden. Nach den Angaben von Abderhalden und seinen Mitarbeitern sollen die erwähnten racemischen Aminosäuren von Hefezellen asymmetrisch gespalten werden. Interessant wird eine Untersuchung, wie sich die nach Waldschmidt-Leitz isolierten Proteasen gegen diese Substrate verhalten.

Ob die von Abderhalden und Stix (Fermentf. 8, 179) gefundene Spaltung von Glycyl-3,5-dijod-l-tyrosin von einer eigentlichen Peptidase vermittelt wird, bleibt noch unentschieden. Die Einwirkung von Darmenzymen auf andere Glycinderivate hat Clementi[3] untersucht.

Polypeptide sind bekanntlich nunmehr in erheblicher Zahl aus Eiweissstoffen isoliert worden[4]. Zur Struktur-Aufklärung verwendet Abderhalden weitgehend die Drehungsänderungen beim Abbau, daneben rein chemische Methoden, wie Kuppelung mit Naphthalinsulfochlorid usw.

Eine Übersicht über die Eigenschaften der Polypeptide gibt Fischer in seinem schon mehrfach zitierten Vortrag (l. c. S. 575). Als Substrate für Enzymstudien eignen sie sich in erster Linie dadurch, dass sie sich chemisch rein gewinnen lassen und auch durch ihre im Vergleich zu Aminosäuren grössere Löslichkeit und durch ihr relativ hohes Drehungsvermögen. Charakteristische Reaktionen, welche sie einerseits von den Aminosäuren, andererseits von den Peptonen unterscheiden würden, existieren nicht, vielmehr sind die Übergänge, wie auch wohl zu erwarten ist, kontinuierliche.

2. Peptone.

Peptone sind Abbauprodukte der Proteine sowohl bei der Spaltung durch eigentliche Proteasen als bei der Spaltung durch Säuren, und sie werden selbst weiter zu Aminosäuren zerlegt.

Die grosse Ähnlichkeit der Peptone mit den künstlichen Polypeptiden lässt vermuten, dass die charakteristische Peptidbindung in Peptonen vorherrscht. Immerhin ist es noch nicht sicher, dass die Peptone von anderen Bindungen, z. B. solchen, welche durch die Hydroxyle der Oxyaminosäuren vermittelt werden, frei sind.

---

[1] Abderhalden und Handovsky, Beitrag zur Frage des Einflusses der Struktur und Konfiguration des Substrates (Polypeptide) auf die Fermentwirkung. Fermentf. 4, 316; 1921. — Siehe auch Abderhalden und Buadze, Fermentf. 8, 487; 1925.

[2] Abderhalden, Glaubach, Goto und Tanaka, Fermentf. 6 und 7; 1922/23. — Abderhalden, H. 130, 205; 1923. — Abderhalden, Pieper und Tateyama, Fermentf. 8, 579; 1926.

[3] Clementi, Atti Acad. dei Lincei (5) 29, 327; 1920.

[4] Fischer und Abderhalden, Chem. Ber. 40, 3553; 1907. — Abderhalden, H. 58, 373; 1908.

Von den chemischen Eiweissreaktionen finden wir die den einzelnen Aminosäuren zukommenden Farbenreaktionen in den Peptonen wieder, die Biuretraktion tritt mit schön roter Farbe auf, wie auch in den höchsten synthetischen Polypeptiden.

Peptonpräparate sind stets Mischungen der verschiedenen polypeptidartigen Abbauprodukte. Charakterisiert sind diese Peptonmischungen durch ihre hohe Löslichkeit in Wasser, sowie gegenüber genuinen Eiweisskörpern dadurch, dass sie weder von Salpetersäure, noch in schwach saurer Lösung von Ammoniumsulfat, von Chlornatrium, Ferrocyankalium, noch von Pikrinsäure oder Trichloressigsäure gefällt werden. Dagegen fällen Sublimat-Natriumchlorid, Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, sowie hochprozentiger Alkohol.

Aus Peptonpräparaten können die höchstmolekularen Anteile durch Aussalzen, die niedrigsten Peptide durch geeignet geleitete Dialyse entfernt werden. Säuren und Alkalien gegenüber verhalten sich die Peptone wie die Polypeptide; die Bindungen zwischen den verschiedenen Aminosäurepaaren werden verschieden leicht gelöst.

B. Peptonspaltende Säfte und Sekrete.

1. In Tieren.

Schon nach dem im 16. Kapitel Gesagten ist es ohne weiteres ersichtlich, dass sowohl Pankreassaft als Darmsaft höherer Tiere und ferner Autolyse-Saft der Hefe gleichzeitig Trypsin und Peptidase enthalten und also Peptone enzymatisch vollständig abzubauen vermögen. Auf die wichtigen Arbeiten von Otto Cohnheim[1] ist an anderer Stelle hingewiesen. Die ersten Beobachtungen über die Peptonspaltung an der Darmschleimhaut stammen von Salvioli (1880) und von Hofmeister[2]. Die Frage, ob und wo die Komponenten des Darmsaftes secerniert werden — nach Falloise[3] wird das Erepsin aus den Lieberkühnschen Drüsen abgeschieden — gehört in den III. Teil dieses Werkes. Nicht uninteressant ist im Licht der neueren Forschung, dass Foa[4] aus einer monatelang isolierten Vellaschlinge erepsinfreien Darmsaft erhielt, was wohl mit der geringeren Beständigkeit der Peptidase zusammenhängt.

Mit Fistelsaft einer isolierten Darmschlinge erhielten Abderhalden und Teruuchi[5] Spaltung von Glycyl-glycin.

---

[1] Cohnheim, H. 33, 451; 1901. — 36, 13; 1902. — 47, 286; 1906. — 49, 64; 1906. — 51, 45; 1907.

[2] Hofmeister, H. 6, 51; 1881.

[3] Falloise, Arch. intern. Phisiol. 2, 299; 1904.

[4] Foa, Arch. di Fisiol. 5, 1; 1908.

[5] Abderhalden und Teruuchi, H. 49, 1; 1906.

Botazzi[1] fand die peptonspaltende Wirkung des Darmes nach anhaltendem Fasten minimal, was wohl auf einen geringen Trypsingehalt hindeutet.

Weitere Angaben über Peptonspaltung im Darm von Tieren: Vernon[2], Weinland[3], Nakayama[4], N. Sieber und Simonowski[5]. Eine neuere Untersuchung über die Beziehungen der peptolytischen Wirkung des Darmerepsins zur chemischen Konstitution des Substrates verdankt man Clementi[6].

Peptonspaltung im Pankreassaft: Schaeffer und Terroine[7], Zunz[8], Bayliss und Starling[9], Wohlgemuth[10] u. a.

Organe: Niere scheint Peptone am kräftigsten zu spalten; Hedin hat diese Wirkung näher untersucht[11]. Darauf folgen Leber, Lunge, Milz[12], Lymphdrüsen[13], Muskel. Cohnheim[14], Kobzarenko[15], Bergell[16], Maeda[17].

Peptonspaltung durch Enzyme des Menschenharns haben Hedin und Masai[18] beobachtet und dieselbe näher studiert.

Peptidasen-Haushalt bei Epileptikern: H. Pfeiffer und Mitarb. Klin. Woch. 4, 1122.

In diesem Zusammenhang wären auch die zahlreichen Arbeiten über Autolyse zu nennen, insofern sie den Abbau von zugesetzten Peptonen besonders oder in Zusammenhang mit der gesamten Eiweissspaltung behandeln. Die Literaturzitate können sich auf die grundlegenden Arbeiten von Salkowski[19], Schwiening[20], Biondi[21] und M. Jacoby[22] beschränken, unter Hinweis auf die Besprechung der Autolyse in Kap., 21 sowie auf die neueren Arbeiten von Dernby[23], von Bradley[24], von Rona und Mislowitzer[25].

---

[1] Botazzi, Arch. di Fisiol. 5, 317; 1908.
[2] Vernon, Jl of Physiol. 32, 33; 1905. — 33, 81; 1905.
[3] Weinland, Zs f. Biol. 45, 293; 1904.
[4] Nakayama, H. 41, 348; 1904.
[5] Sieber und Simonowski, H. 36, 255; 1902.
[6] Clementi, Atti Accad dei Lincei 29 (5), 327; 1920.
[7] Schaeffer und Terroine, Jl de Physiol. et Path. 12, 884 und 905; 1910.
[8] Zunz, Arch. int. Physiol. 11, 191; 1912.
[9] Bayliss und Starling, Jl. of Physiol. 30, 61; 1903.
[10] Wohlgemuth, Biochem. Zs 39, 302; 1912.
[11] Hedin, H. 122, 307; 1922.
[12] Hedin, Jl Biol. Chem. 54, 177; 1922.
[13] Hedin, H. 125, 289; 1923.
[14] O. Cohnheim und Pletnew, H. 69, 108; 1910.
[15] Kobzarenko, Biochem. Zs 66, 344; 1914.
[16] Bergell und Liepmann, Münch. med. Woch. 1905. 46.
[17] Maeda, Biochem. Zs 143, 347; 1923.
[18] Hedin und Masai, H. 100, 263; 1917.
[19] Salkowski, Zs klin. Med. 17. Suppl. Bd. 79, 1891.
[20] Schwiening, Virch. Archiv 136, 444; 1896.
[21] Biondi, Virch. Archiv 144, 373; 1896.
[22] M. Jacoby, H. 30, 149; 1900.
[23] Dernby, Biochem. Zs 81, 109; 1917. — Jl Biol. Chem. 35, 179; 1918.
[24] Bradley, Physiol. Reviews 2, 415; 1922. — Jl Biol. Chem. 50, 14; 1922. — 52, 467; 1922.
[25] Rona und Mislowitzer, Biochem. Zs 140, 517; 1923. — 146, 26; 1924.

2. In Pflanzen.

Höhere Pflanzen. Die ersten Arbeiten, welche Peptonspaltung in pflanzliche Organen bewiesen, verdankt man L. Iwanow[1] (Endosperm-Embryo bei Phaseolus und Cucurbita), Vines[2] (Samen von Phaseolus, Vicia u. a.) und Dean[3].

Weitere Literatur: Court[4] (keimende Gerste); Adler[5] (Malz); Deleanu[6] (Ficus calica); Blood[7] (Blätter von Brassica oleracea); Blagoveschenski und Bielozerski[8] (Blätter).

Pilze und Bakterien: Hier sind die Arbeiten von Kutscher[9] (Hefe) und von Pfaundler[10] (Bakterien) ihres historischen Interesses wegen zu erwähnen. Grundlegende Versuche verdankt man Geret und Hahn[11]. D. Court hat auch einige Versuche mit Schimmelpilzen ausgeführt.

Auf die neueren Arbeiten von Fodor und seinen Mitarbeitern[12] über die Wirkung von Hefemazeraten und von ungekeimten Erbsen kommen wir S. 435 zurück.

C. Darstellung und Reinigung peptonspaltender Enzympräparate.

Reindarstellungen eines „peptonspaltenden Enzyms“ können insofern nicht in Betracht kommen, als am gesamten Abbau Pepton → Aminosäuren wenigstens zwei Enzyme, eine Tryptase und eine Peptidase beteiligt sind. Es kann sich also nur darum handeln, dieses in einem Ausgangsmaterial vorliegende Gemisch von inaktiven Begleitstoffen zu befreien und anzureichern, so dass der Wirkungsgrad der Gewichtseinheit Trockensubstanz erhöht wird.

Es kann hier zunächst auf die S. 406 gemachten Angaben verwiesen werden. Besonders empfehlenswert ist wohl in den meisten Fällen Herstellung von Glycerinextrakten. Aus diesen lassen sich durch Fällen mit abs. Alkohol oft wirksame und haltbare Trockenpräparate gewinnen. Glycerinextrakte von Darm enthalten allerdings neben eigentlicher Peptidase nur wenig peptonspaltende Enzyme. Für die weitere Behandlung findet man Anhaltspunkte in den Arbeiten von Willstätter und Mitarbeitern und besonders in denen von Waldschmidt-Leitz.

[1] L. Iwanow, Beitr. Bot. Zbt. I 29, 144; 1913.
[2] Vines, Ann. of Bot 18—14; 1904—1910.
[3] Dean, Bot. Gaz. 40, 121; 1905.
[4] Dorothy Court, Proc. Roy. Soc. Edinburgh 34 (II), 113; 1914.
[5] Adler, Zs ges. Brauw. 38, 129; 1915.
[6] Deleanu, Bull. Acad. Roum. 9, 345; zit. nach Chem. Zbt. 1916, II 498.
[7] Blood, Jl Biol. Chem. 8, 215; 1910.
[8] Blagoveschenski und Bielozerski, Biochem. Jl 19, 355; 1925.
[9] Kutscher, H. 33, 59; 1901.
[10] Pfaundler, Zbt. Bakt. 31, 113, 1902.
[11] Geret und Martin Hahn, Chem. Ber. 31, 2335; 1898.
[12] Fodor, Bernfeld und Schönfeld, Koll. Zs 37, 32, 159; 1925. — Fodor und Schönfeld, Koll. Zs 39, 56, 240; 1926. — Fodor, Grundlagen der Dispersoidchemie.

Abderhalden und Fodor[1] stellen Hefesäfte dar durch das Mazerieren der getrockneten Hefe mit einer 0,6—0,7 proz. Kochsalzlösung. Mazerationen aus Erbsenmehl bereiten Fodor und Schönfeld. Enzymatische Rohpräparate für die Peptonspaltung findet man in der Literatur häufig beschrieben. Es muss von vornherein betont werden, dass man bei Verwendung solcher Präparate mit Peptonen (etwa Witte-Pepton) als Substrat auf genau definierte Verhältnisse verzichtet und dass sich diese Arbeitsweise also nur für besondere Fälle eignet.

Unter besonderen Darstellungsversuchen aus neuerer Zeit seien diejenigen von Fodor angeführt. Wenn hier Teile aus Fodors letzten Arbeiten eingehend referiert werden, so geschieht dies besonders, um auch einer Arbeitsrichtung und wissenschaftlichen Anschauungen[2], welche von den in diesem Buch vertretenen nicht unerheblich abweichen, Raum zu geben, so dass der Leser selbst ein Urteil über Art und Tendenz dieser Richtung gewinnt und evtl. auf die Originalarbeiten zurückzugehen veranlasst wird.

Ein Hinweis auf diese Arbeiten erscheint um so mehr gerechtfertigt, als dieselben für die kolloidchemische Richtung der Enzymforschung, wie sie u. a. besonders in den Arbeiten von Abderhalden und Fodor zum Ausdruck kommt, kennzeichnend sind. „Abderhalden und Fodor[3] erbrachten" — schreibt Fodor[4] — „mehrfache Beweise dafür, dass wir das Wesen der ersteren (der Fermentwirkungen) hauptsächlich mit Hilfe von kolloidchemischen Betrachtungen und Vorstellungen erklären können."

Fodor kennzeichnet neuerdings seine Auffassungen durch die Zusammenfassung seiner Ergebnisse[5] folgendermassen:

1. Die Peptidase ist im Hefemazerat im wesentlichen an Proteine gebunden, unter Umständen ausserdem aber auch an noch unbekannte Stoffe X, die nach aller Wahrscheinlichkeit Abbauprodukte der Proteine darstellen.

2. Solange die Peptidase mit dem Protein — und zwar ist es das Hefephosphorprotein — verbunden ist, sind ihre wesentlichen Merkmale vom Zustand des Proteins abhängig. Als Zustandsvariationen kommen die Veränderungen des Dispersitätsgrades des Proteins von „nativen" bis zum durch Säure ausgeflockten Koagulum in Betracht, ferner nach dem alkalischen Intervall der (H^+)-Skala zu, die Verteilung und Solvatationsstufe, die bis zum merkbar hydratisierten Alkaliprotein reicht. Jedwede Variation im Kolloidzustande des Proteinträgers zieht eine Änderung der fermentativen Aktivität nach sich[6].

3. Die Trennung der Peptidase von der Proteinmasse kann durch Kaolin erfolgen. Beide gehen mit Leichtigkeit in das Kaolinadsorbat über. Nach erfolgter totaler Adsorption des Proteins ergibt sich indessen ein Filtrat, das immer noch merkbar aktiv ist und also die

---

[1] Abderhalden und Fodor, Fermentf. 1, 532; 1916.

[2] Siehe Fodors Monographien: Das Fermentproblem, Dresden-Leipzig 1925. — Die Grundlagen der Dispersoidchemie, Dresden-Leipzig 1925.

[3] Abderhalden und Fodor, Fermentf. 1, 583; 1616. — 2, 74, 151; 211. 225. 1919.

[4] Fodor, Fermentf. 3, 193; 1920.

[5] Fodor und R. Schönfeld, Koll. Zs 39, 240; 1926. — Siehe auch die vorangehenden Arbeiten: Fodor, Bernfeld und Schönfeld, Koll. Zs 37, 32, 159; 1925. — Fodor und Schönfeld, Koll. Zs 39, 56; 1926.

[6] Fodor, Fermentf. 4, 209; 1920. — Koll. Zs 29, 28; 1921.

Peptidase in irgendeiner Form enthalten muss. Noch mehr Kaolin adsorbiert auch diesen restlichen Teil des Fermentes.

4. — — — — — —

5. Die Anwendung einer relativ kleinen Kaolinmenge ergibt ein Adsorbat plus ein Filtrat, deren Aktivität zusammen mehr beträgt, als jene des ursprünglichen Mazerates. Bei gesteigerten Kaolinmengen sinkt diese Summe herab...

6. Es gelingt mit Hilfe von Glykokoll bei nahezu absoluter Neutralität die Peptidase aus diesen Adsorbaten herauszulösen (zu eluieren), wobei sich Eluate ergeben, die mit den empfindlichsten Eiweissfällungsmitteln keine sichtbaren Reaktionen mehr zeigen. Die Glykokolleluate sind durch Kaolin erneut adsorptionsfähig, liefern jedoch Adsorbate, die einer zweiten Elution nicht mehr zugänglich sind.

7. 8. — — — — — —

9. Die Reaktionskinetik [1] der einzelnen aktiven Lösungen und Adsorbate ist verschieden. Im nativen Mazerat variert die Zeitkurve je nach der (H^+)-Konzentration und dem dadurch hervorgerufenen Kolloidzustand des Proteinträgers von der scheinbaren Reaktion 0. Ordnung bis zu parabolischen Formen beträchtlicher Krümmungsverschiedenheit. Dabei rufen grobe Zustandsformen vorzüglich die Reaktionen 0. Ordnung hervor.

Kaolinadsorbate ergeben ebenfalls Zeitkurven, deren Formen eine Reaktion 0. Ordnung verdolmetschen, indes die eiweissfreien Filtrate, die aus dem Mazerate nach erfolgter Adsorption entstehen, parabolisch gekrümmte Zeitkurven aufzuweisen pflegen.

Es ergibt sich daraus, dass die Zeitumsatzkurven nicht nur für das Ferment, sondern auch für den Träger des letzteren charakteristisch sind.

10. Um diesen Erscheinungen einen symbolischen Ausdruck zu verleihen, haben wir ein mehrgliedriges System postuliert, als dessen festes Glied die sogenannte „zymohaptische Substanz ZyS“ in allen Formen der Peptidase bzw. in allen ihren diversen Milieus wiederzufinden ist. Etwas Bestimmtes wurde über diesen Bestandteil dadurch nicht ausgesagt, sein Wesen blieb vielmehr durchaus hypothetisch.

Diese ZyS wird nunmehr im Milieu des Mazerates an das Protein gebunden gefunden, das hier die Rolle eines polydispersen Fermentträgers, eines Fermentkolloids übernimmt. Dieser Bindung gaben wir das Symbol Fk-ZyS. Ausserdem kommt in diesem Milieu noch die Form X-ZyS vor.

Fodor und seine Mitarbeiter benützen in ihren weiteren Ausführungen für den Träger der ZyS den allgemeinen Ausdruck zymophorer Stoff. „Diese beiden, der zymophore Stoff und die ZyS bilden zusammen, im allgemeinen wenigstens, das Fermentsystem oder Enzymsystem.“

„Es gibt — schreiben Fodor und Schönfeld l. c. S. 246 — keine Enzymmoleküle unseres Wissens, es gibt lediglich Enzymsysteme, die aber eine multiple Zusammensetzung besitzen. Die ZyS aktiviert eine zymophore Substanz, die jedoch ihrerseits austauschbar ist. Die Aktivierung ist eine wahre Aktivierung, da das Fermentsystem die physikalischen Eigenschaften der zymophoren Substanz annimmt. Solange diese polydispers ist, ist es auch das Fermentsystem.

Wie ersichtlich machen die theoretischen Ansätze und Arbeitshypothesen von Fodor einen ganz anderen Gang der Reinigungs- und Trennungsarbeit erforderlich als den bisher eingeschlagenen. Wegen der Einzelheiten muss auf die Mitteilungen dieses Forschers in der Kolloid-Zeitschrift verwiesen werden. Zur M thode von Fodor und R. Schönfeld sei nur noch bemerkt, dass sie die Aktivitätsprüfung ihrer Präparate an Seidenpepton (Farbwerke Höchst) vornehmen.

[1] Fodor und Chasuva Epstein, Koll. Zs 37, 168; 1925.

D. Kinetische Messungen.

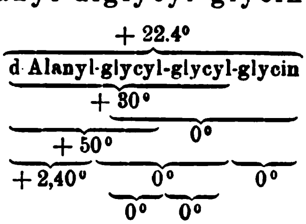
Dass mit Peptonen als Substrat keine streng gültigen Gesetzmässigkeiten ermittelt werden können, ist ohne weiteres klar. Aber auch an der Spaltung höherer Peptide durch ungereinigte bezw. enzymatisch nicht einheitliche Lösungen, wie es die Organ- oder Hefenextrakte sind, dürften in noch nicht näher untersuchtem und mit dem Versuchsmaterial variierendem Verhältnis mehrere Enzyme teilnehmen. Was also bisher an Zahlenmaterial über den zeitlichen Verlauf der Tri- und Polypeptidspaltungen und über den Einfluss wechselnder Substrat- und Enzymmengen angegeben wurde, hat nur den Charakter von orientierenden Beobachtungen, welche durch Versuche mit einheitlichen Enzymlösungen zu ergänzen sind. Immerhin können manche der älteren Messungen wertvolle Fingerzeige für die weitere Forschung geben.

Die ältesten Versuche über Tri- und Tetrapeptid-Spaltung sind wohl von Abderhalden und Koelker[1] beschrieben; einige ihrer Versuchsreihen seien angeführt.

Spaltung des d-Alanyl-glycyl-glycins mit Hefepresssaft.

Zeit in Minuten	a) 1,66 ccm Stammlösung = $^1/_{1000}$-mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 3,84 ccm H_2O	b) 3,32 ccm Stammlösung = $^2/_{1000}$-mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 2,18 ccm H_2O	c) 4,98 ccm Stammlösung = $^3/_{1000}$-mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 0,52 ccm H_2O
	Abgelesener Winkel in Graden		
7	+ 0,75 (+ 0,82)	+ 1,41 (+ 1,48)	+ 2,24 (+ 2,31)
17	+ 0,50 (+ 0,57)	+ 1,13 (+ 1,20)	+ 1,99 (+ 2,06)
25	+ 0,43 (+ 0,50)	+ 0,93 (+ 1,00)	+ 1,63 (+ 1,70)
33	+ 0,33 (+ 0,40)	+ 0,73 (+ 0,80)	+ 1,42 (+ 1,49)
46	+ 0,22 (+ 0,29)	+ 0,57 (+ 0,64)	+ 1,17 (+ 1,24)
54	+ 0,14 (+ 0,21)	+ 0,37 (+ 0,44)	+ 0,89 (+ 0,96)
66	+ 0,07 (+ 0,14)	+ 0,25 (+ 0,32)	+ 0,66 (+ 0,73)
79	+ 0,12 (+ 0,19)	+ 0,15 (+ 0,22)	+ 0,51 (+ 0,58)
88	+ 0,07 (+ 0,14)	+ 0,08 (+ 0,15)	+ 0,33 (+ 0,40)
98	+ 0,07 (+ 0,14)	+ 0,05 (+ 0,12)	+ 0,23 (+ 0,30)
117	+ 0,06 (+ 0,13)	+ 0,02)+ 0,09)	+ 0,18 (+ 0,25)
202	+ 0,03 (+ 0,10)	+ 0,00 (+ 0,07)	+ 0,06 (+ 0,13)
347	— 0,01 (+ 0,06)	— 0,01 (+ 0,06)	+ 0,05 (+ 0.12)

Spaltung von d-Alanyl-diglycyl-glycin mit Hefepresssaft.



[1] Abderhalden und Koelker, H. 55, 416; 1908.

Zeit in Minuten	a) 0,83 ccm Stammlösung = $^1/_{2000}$-mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 4,67 ccm Wasser	b) 1,66 ccm Stammlösung = $^1/_{1000}$-mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 3,84 cmm Wasser	c) 3,33 ccm Stammlösung = $^2/_{1000}$-mol. 1,0 ccm Hefepresssaft 2,17 ccm Wasser
	Abgelesener Winkel in Graden		
8	+ 0,42 (+ 0,49)	+ 0,59 (+ 0,66)	+ 1,34 (+ 1,41)
17	+ 0,28 (+ 0,35)	+ 0,36 (+ 0,43)	+ 1,16 (+ 1,23)
23	+ 0,25 (+ 0,32)	+ 0,29 (+ 0,36)	+ 0,90 (+ 0,97)
31	+ 0,20 (+ 0,27)	+ 0,20 (+ 0,27)	+ 0,83 (+ 0,90)
46	+ 0,14 (+ 0,21)	+ 0,05 (+ 0,12)	+ 0,52 (+ 0,59)
56	+ 0,11 (+ 0,18)	+ 0,00 (+ 0,07)	+ 0,43 (+ 0,50)
66	+ 0,13 (+ 0,20)	— 0,01 (+ 0,06)	+ 0,26 (+ 0,33)
78	+ 0,11 (+ 0,18)	— 0,05 (+ 0,02)	+ 0,13 (+ 0,20)

Abderhalden und Koelker schlossen aus diesen Versuchen, dass in beiden Fällen das d-Alanin zuerst frei wurde.

Diese älteren Versuchsreihen wurden dann von der Abderhaldenschen Schule 1916 wieder aufgenommen und zwar in grösserem Umfange von Abderhalden und Fodor. Von den weiteren Arbeiten seien noch die von Abderhalden und Handovsky[1] erwähnt.

Sie fassen ihre Versuche folgendermassen zusammen:

1. Hefemazerationssaft, der imstande war, Glyzyl-l-Leuzin und Glyzyl-l-leuzyl-glyzil-l-leuzin zu spalten, war nicht imstande, Glyzyl-d-leuzyl-l-leuzin zu zerlegen. Das Tetrapeptid, das ausschliesslich aus in der Natur vorkommenden Aminosäuren aufgebaut war, wurde ohne Zweifel an allen drei Stellen gespalten und in seine 4 Bausteine zerlegt. Es ergibt sich aus der Tatsache, dass der Aminostickstoff um mehr als 200 Proz. vermehrt wurde.

2. Es konnte auch hier gezeigt werden, dass die Spaltung um so rascher verläuft, je grösser die Konzentration des Hefemazerationssaftes bei gleicher Peptidkonzentration ist.

3. Aus den Versuchen geht mit grösster Wahrscheinlichkeit hervor, dass auch das nicht spaltbare Tetrapeptid an Fermente gebunden wird. Es ist also nicht die Kombination Substrat und Ferment spezifisch, sondern die Spaltung als solche. Dieser Befund soll weiter verfolgt werden.

Es geht aus den späteren Untersuchungen nicht hervor, ob dieser Schluss bezüglich der nicht-spezifischen Kombination von Enzym und Substrat von der Abderhaldenschen Schule heute noch aufrecht erhalten wird. Der Verfasser vermag ihn auch aus den Zahlen von Handovsky nicht zu entnehmen; bei Kohlehydrat-Hydrolasen ist die Bindung Enzym-Substrat sicher spezifisch.

Kinetische Messungen an Wittepepton hat auch Hedin angestellt (Jl of Physiol 32; 1905).

E. Einfluss der Acidität auf die Polypeptid- und Peptonspaltung.

Da die Enzyme, wie sie in Enzymgemische vom Typus des Pankreatins Rhenania eingehen, eine Peptidase und ein tryptisches Enzym enthalten, welche beide ihr Wirksamkeitsoptimum bei einer Acidität nahe bei pH = 8 besitzen,

[1] Abderhalden und Handovsky, Fermentf. 4, 316; 1921.

so erhält man für die Peptonspaltung im ganzen ebenfalls ein Optimalgebiet bei dieser Acidität. (Michaelis und Davidsohn)[1].

Was die Abhängigkeit dieses Optimalgebietes vom Substrat betrifft, so wurde dieselbe, wie schon früher erwähnt, von Abderhalden und Fodor zunächst an Dipeptiden festgestellt, gilt nach ihren Messungen aber auch bei höheren Peptiden, wie der folgende Auszug aus einer von Abderhalden und Fodor[2] gegebenen Tabelle zeigt.

Polypeptid und Autor der Darstellung	*p*H	ccm n/50 NaOH nach			
		10′	20′	30′	40′
l-Leucyl-glycin $[\alpha]_D^{20} = +85{,}5^\circ$ E. Fischer, Berichte der Deutsch. Chem. Gesellschaft 39, 2893 (1906)	6,64	0,49	0,55	—	0,99
	7,24	—	0,73	—	1,18
	7,56	0,53	1,08	—	1,26
	7,86	0,47	0,84	—	1,01
l-Leucyl-glycyl-glycin $[\alpha]_D^{20} = +45{,}90^\circ$ E. Abderhalden und A. Fodor, ebenda 49, 561 (1916)	6,22	0,17	0,31	0,47	0,64
	6,66	0,25	0,51	0,68	0,73
	7,26	0,34	0,57	0,76	0,91
	7,80	0,35	0,57	0,69	0,79
	8,29	0,16	0,26	0,35	0,47
l-Leucyl-diglycyl-glycin $[\alpha]_D^{20} = +45{,}8^\circ$ E. Fischer, ebenda 39, 2893 (1906)	6,74	0,08	0,18	—	0,22
	7,29	0,19	0,32	—	0,45
	7,68	0,18	0,23	—	0,30
l-Leucyl-triglycyl-glycin $[\alpha]_D^{20} = +28{,}14^\circ$ E. Abderhalden und A. Fodor, loc. cit.	6,89	0,12	0,17	—	0,27
	7,28	0,12	0,18	0,24	0,34
	7,56	0,07	0,19	0,23	0,27
	8,09	0,03	0,08	0,15	—
	8,50	0,04	0,06	—	—
l-Leucyl-pentaglycyl-glycin $[\alpha]_D^{20} = +5{,}94^\circ$ E. Abderhalden und A. Fodor, loc. cit.	6,16	0,00	—	—	0,16
	6,64	0,23	0,28	—	0,31
	7,33	0,12	0,19	—	0,24

Hier sei auch noch eine der von Hedin und Masai[3] mit Harn-Erepsin (H. E.) und Witte-Pepton als Substrat angestellten Versuchsreihen erwähnt. Eine 4%ige Lösung von dem Pepton wurde zwei Tage dialysiert, mit HCl möglichst neutralisiert, filtriert und für die Bereitung folgender Probe verwendet:

1. 25 ccm H. E. + 50 ccm Pepton + 5 ccm H_2O.
2. 25 „ H. E. + 50 „ „ + 2 „ 0,1 n-NaOH + 3 ccm H_2O.
3. 25 „ H. E. + 50 „ „ + 3 „ 0,1 n-NaOH + 2 „ H_2O.
4. 25 „ H. E. + 50 „ „ + 4 „ 0,1 n-NaOH + 1 „ H_2O.
5. 25 „ H. E. + 50 „ „ + 5 „ 0,1 n-NaOH.
6. Kontrolle mit erhitztem H. E.

[1] Michaelis und Davidsohn, Biochem. Zs 36, 280; 1911.
[2] Aberhalden und Fodor, Fermentf. 1, 583 und zw. 585; 1916.
[3] Hedin und Masai, H. 100, 263; 1917.

Nach 4 Tagen bei 37° 40 ccm Gerbsäure; 100 ccm Filtrat.

Nr. 1	48,75 ccm Säure; reduzierter Wert	12,15.
„ 2	49,6 „ „ „ „	13,0.
„ 3	50,1 „ „ „ „	13,5.
„ 4	50,25 „ „ „ „	13,65.
„ 5	50,05 „ „ „ „	13,45.
„ 6	36,6 „ „	

Hedin und Masai „finden die beste Wirkung bei schwach alkalischer Reaktion. Die Proben 2—5 reagierten deutlich alkalisch gegen Lackmus".

F. Einfluss von Salzen und Nichtelektrolyten.

Die von Abderhalden und Fodor[1] untersuchten Salzwirkungen werden von diesen Forschern im kolloid-chemischen Sinne gedeutet.

Nichtelektrolyte. Antiseptische Stoffe, wie Toluol, Chloroform, Thymol, fand Fodor[1] ohne Einfluss.

Äthyl- und Methylalkohol sowie Glycerin hemmen (Blagowestschenski[2]).

G. Einfluss der Temperatur und Strahlung auf die enzymatische Peptonspaltung.

Nach Cohnheim[3] wird das peptonspaltende Enzym der Darmschleimhaut bei 63° vollständig zerstört. Optimum der gleichen Wirkung nach Raubitschek[4] bei 38°.

Einige weitere Angaben bei Kobzarenko[5].

Radiumbromid hemmt die Peptonspaltung nach Bergell und Braunstein[6]. Emanation ohne Wirkung (Jansen[7]), ebenso Thorium X (Plesch[8]).

H. Versuche über Synthese von Polypeptiden und Peptonen.

Hinsichtlich der interessanten Studien von Henriques und Gjaldbaek über „Plasteinbildung" sei teils auf das im I. Teil des Werkes Mitgeteilte hingewiesen, teils auf Kapitel 20.

Einer Mitteilung von Abderhalden[9] sei folgendes entnommen: Abderhalden hat aus Leber, Niere, Schilddrüse und Lunge mittels Magensaft, Pankreassaft und Darmpresssaft Aminosäuregemische bereitet. Die Verdauung dauerte im ganzen 8 Monate. Jedes einzelne Produkt wurde genau analysiert. In keinem waren nachweisbare Mengen von Polypeptiden vorhanden. Die Biuretprobe fiel negativ aus.

---

[1] Abderhalden und Fodor, Fermentf. 4, 191; 1920.
[2] Blagowestschenski, Biochem. Zs 168, 6; 1926.
[3] Cohnheim, H. 35, 134; 1902. — Siehe auch Euler, H. 51, 213; 1906.
[4] Raubitschek, Zs f. exp. Pathol. u. Therap. 4, 674; 1907,
[5] Kobzarenko, Biochem Zs 66, 344; 1914.
[6] Bergell und Braunstein, Med. Klin. 1905, 310.
[7] Jansen, Biochem. Zbt. 8, 759.
[8] Plesch, Zs f. exp. Pathol. 12, 1; 1912.
[9] Abderhalden, Fermentf. 1, 47; 1914.

Von jedem dieser Produkte wurde eine ca. 20%ige Lösung in physiologischer Kochsalzlösung bereitet. Verwendet wurden für jeden Versuch davon je 100 ccm. Es wurden dann für jedes Aminosäuregemisch folgende Versuchsreihen angesetzt:

1. 100 ccm der Lösung + 25 ccm physiologische Kochsalzlösung.

2. 100 ccm der Lösung + 25 ccm Organmacerationssaft. Das Gemisch wurde eine Stunde lang energisch gekocht.

3. 100 ccm der Lösung + 25 ccm Organmacerationssaft.

Alle Versuche wurden doppelt angesetzt und jedes Aminosäuregemisch mit Macerationssaft aus Leber, Niere, Schilddrüse und Lunge versetzt. Ferner wurden noch Versuche mit Magensaft, Pankreas- und Darmsaft versetzt. Endlich wurde in einigen Fällen Hefemacerationssaft angewandt.

Alle Proben mit einer 2 cm hohen Toluolschicht versehen, sehr gut verschlossen — mit Paraffin abgedichtet. Nach 4 Wochen im Brutschrank war das Ergebnis negativ. Nach 5 Monaten „zeigte sich, dass auffallenderweise die Biuretreaktion bei den Proben deutlich war, bei denen Organmacerationssaft und Aminosäuregemisch vom gleichen Organ stammten. Bei allen anderen Proben war sie entweder ganz negativ oder doch nur schwach angedeutet".

„Bei den Proben, bei denen das Aminosäuregemisch und der Macerationssaft dem gleichen Organ entstammten, waren etwa 5—15% weniger Aminostickstoff als in den anderen Proben nachweisbar."

Nach Abderhalden „unterliegt es keinem Zweifel, dass eine Synthese stattgefunden hatte. Wenn es auch noch nicht gelungen ist, ein wohl definiertes Produkt abzutrennen, so genügen doch die erfolgten Feststellungen, um den Beweis als erbracht zu betrachten, dass aus Aminosäuren unter der Einwirkung von Fermenten Peptone und Eiweiss entstanden waren."

Wenn über den Aufbau von Polypeptiden und Peptonen in vitro noch keine weiteren Angaben gemacht werden können, so darf abschliessend vielleicht hervorgehoben werden, dass das Studium der Peptid-, Pepton- und Eiweiss-Synthesen in der lebenden Zelle und im lebenden Organ vom enzymatischen Standpunkt aus wesentliche Fortschritte verspricht[1]. Hier sind es die pflanzenphysiologischen und pflanzenchemischen Forschungen — es sei nur an die neueren Arbeiten von N. N. Iwanow[2] und von Prjanischnikow erinnert[3] — welche über die Bedingungen, unter welchen die natürliche Synthese stattfindet und über die Reaktionen, welche mit der Peptidbildung aus Aminosäuren gekoppelt sind, Auskunft geben werden.

Auf die Angaben von Levene und Simms (Jl Biol. Chem. 62) über das Gleichgewicht Glycylglycin-Diketopiperazin sei auch hier hingewiesen.

[1] Siehe hierzu Euler und H. Fink, H. 157, 222; 1926.

[2] N. N. Iwanow, Biochem. Zs 162, 425; 1925.

[3] Siehe auch H. Pringsheim, Biochem. Zs 3, 121; 1907 und 8, 119; 1908.

Anhang zum 16. und 17. Kapitel.

Methoden zur Bestimmung der Peptid- und Peptonspaltung.

Soll die Wirkung der Peptidase (oder der Peptidasen) untersucht werden, so sind Dipeptide als Substrate zu verwenden; gegenüber der älteren Methodik, welche oft mit Peptonen gearbeitet hat, sei hier nochmals besonders betont, dass höhere Polypeptide und Peptone, also der grösste Teil der in Peptonpräparaten vorliegenden Gemische von Peptidasen nicht oder nur langsam und unvollständig angegriffen wird.

Unter den zahlreichen Dipeptiden hat man am öftesten Glycyl-glycin als Substrat gewählt, das sich leicht darstellen lässt; es liegt aber kein Grund vor, andere Dipeptide auszuschliessen; über die relativen Spaltungsgeschwindigkeiten von Dipeptiden liegt eine Tabelle von Waldschmidt-Leitz (H. 151, 54) vor, die eine Umrechnung der enzymatischen Wirksamkeit von einem Dipeptid auf ein anderes gestatten würde.

Substrat	$k \cdot 10^4$
Alanyl-glycin	48
Leucyl-glycin	18
Glycyl-tyrosin	6,1
Glycyl-glycin (Mittel)	13
Leucyl-alanin	2,1

Die Methoden, welche die Verfolgung einer Dipeptidspaltung gestatten, sind teils physikalische, teils chemische.

A. Physikalische Methoden.

Wir stellen die hier in Betracht kommenden Methoden aus historischen Gründen voraus; sie sind zuerst zur Untersuchung der Dipeptidspaltung angewandt worden und haben gute Dienste getan, solange die unten beschriebenen chemischen Methoden noch nicht ausgearbeitet waren.

a) Polarimetrie. Mit dieser Methode hat Abderhalden, zuerst mit Koelker[1] und dann mit anderen Mitarbeitern, die Spaltung einer Reihe von Dipeptiden messend verfolgt. Als Substrate eignen sich solche, bei welchen die durch die Reaktion hervorgerufene Drehungsänderung gross ist, z. B. d-Alanyl-d-Alanin, das nach Fischer[2] dargestellt wird.

[1] Abderhalden und Koelker, H. 51, 294; 1907. — 54, 363; 1908.
[2] E. Fischer und Arnold Schulze, Chem. Ber. 40, 954; 1907.

Über die Ausführung der Messungen ist kaum etwas Besonderes zu bemerken. Man berücksichtige die Eigendrehung der enzymhaltigen Säfte.

Bei der Anwendung der Methode ist zu berücksichtigen, dass sich die spezifische Drehung der Aminosäuren durch Salzbildung, also mit der Acidität der Lösung, oft stark ändert.

b) Messung der Leitfähigkeit. Da bei der Spaltung der Dipeptide saure und basische Gruppen frei werden, so ändert sich die Ionenkonzentration der Lösung und somit ihre Leitfähigkeit. Die Methode hat den Vorteil, dass sie sich auch auf nicht drehende Dipeptide anwenden lässt; mit ihr hat Euler[1] die Glycylglycinspaltung gemessen.

Die ersten Leitfähigkeitsmessungen zur Verfolgung der Pepsinspaltung verdankt man Sjöqvist[2]; später haben Bayliss und V. Henri, und in neuerer Zeit besonders Northrop[3] Leitfähigkeitsmethoden beim Studium der Eiweissspaltung benützt.

Verläuft die Enzymreaktion in Gegenwart von Puffersalzen, so macht die Berechnung der Versuchszahlen Schwierigkeiten und in diesen Fällen ist die Methode kaum zu empfehlen.

Der Brechungsindex ändert sich bei der hydrolytischen Spaltung der Gruppe ·CO·NH· in der Regel nur wenig; auch das empfindliche Interferometer wird man mit Vorteil nur in besonderen Fällen anwenden[4].

B. Chemische Methoden.

Ungleich wichtiger als die physikalischen Methoden sind die in den letzten Dezennien ausgearbeiteten chemischen Verfahren, welche gestatten, die bei der Dipeptidspaltung frei werdenden sauren und basischen Gruppen genau und leicht zu bestimmen.

Für die kinetischen Messungen an Peptidasen, also für die Bestimmung der Dipeptide und Aminosäuren kommen in erster Linie in Betracht:

1. Die Formoltitration nach Sörensen,

2. die alkalimetrische Titration in alkoholischer Lösung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz,

3. die Messung des Aminostickstoffs mit salpetriger Säure nach van Slyke, die auch als Mikromethode sehr gute Resultate liefert.

Vielfache Anwendung findet sowohl bei der Messung der Peptidasen als bei der Untersuchung der eigentlichen Proteasen die Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl, besonders in ihrer Ausführungsform als

[1] Euler, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 2, Nr. 31; 1906.

[2] Sjöqvist, Skand. Archiv f. Physiol. 5, 277; 1893.

[3] Northrop, Jl gen. Physiol. 4, 227; 1921/22.

[4] Siehe Hirsch, Klin. Woch. 1925. Nr. 28 u. 29.

Mikroverfahren[1]. Die Mikro-Kjeldahl-Methode, welche den Gesamtstickstoff der zu untersuchenden Lösung ergibt, wird dann geeignet mit einer der oben genannten Methoden kombiniert.

1. Formoltitration nach Sörensen und Jessen-Hansen[2].

Das Prinzip dieser Methode beruht bekanntlich darauf, dass nach der Gleichung

$$HCHO + H_2N \cdot CH_2 \cdot COOH \overset{+ NaOH}{\leftrightarrows} CH_2 : N \cdot CH_2 \cdot COONa + 2\, H_2O$$

die freien Aminogruppen verbraucht werden, wodurch die Carboxylgruppen alkalimetrisch titriert werden können.

Wird die Spaltung eines Dipeptides verfolgt, indem man der Reaktionslösung von Zeit zu Zeit Proben entnimmt und diese mit Formol titriert, so entspricht einem neugebildeten titrierbaren Carboxyl eine äquivalente Menge Dipeptid.

Folgende Lösungen werden gebraucht:

1. 0,5 n-Lösung von NaOH,
2. 0,5 n-Lösung von HCl,
3. Lösung von 0,5 g Thymolphthalein in 1 l 93%igem Alkohol.
4. Formolmischung, frisch bereitet. Zu 50 ccm käufl. Formol werden 25 ccm absoluten Alkohols, 5 ccm Thymolphthaleinlösung und 0,5 n-Natronlauge bis zum schwachgrünlichen oder bläulichen Farbton zugesetzt.

Um den Endpunkt der Titration richtig zu finden, stellt man sich eine Kontrolllösung her: Sie wird bereitet mit 20 ccm ausgekochten Wassers, zu welchem 15 ccm der Formolmischung und die halbe Menge Barytlauge wie bei den Analysen zugesetzt wird, worauf man zurücktitriert, bis die Lösung bläulich opalesziert. Dann werden 2 Tropfen Barytlauge zugegeben (deutlich blaue Farbe) und schliesslich noch 2 Tropfen derselben Lauge, wodurch die Lösung eine stark blaue Farbe erhält (pH = 9,7) (vgl. Sörensen, l. c. S. 54).

Ausführung.

Nach Sörensens Vorschrift titriert man die Analysen bis zu letzterer Farbenstärke, indem man zu 20 ccm der zu untersuchenden Lösung zuerst 15 ccm Formolmischung und darauf einen kleinen Überschuss von Barytlauge zusetzt. Man titriert mit Salzsäure zurück, bis die Farbe schwächer als die der Kontrolllösung ist, und gibt tropfenweise Lauge zu, bis die Farbe der Kontrolllösung genau erreicht ist.

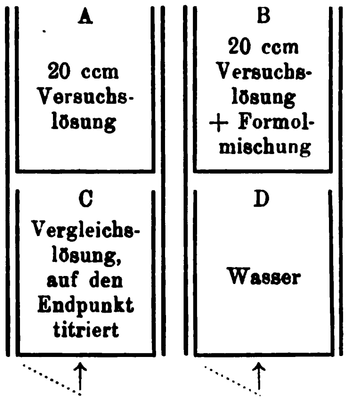
Hat man gefärbte Lösungen zu untersuchen, so bedient man sich — sofern

[1] Siehe z. B. die Untersuchungen über Autolyse von Rona und Mislowitzer. Biochem. Zs 140—146; 1923/24.

[2] Sörensen, Biochem. Zs 7, 43; 1907. — 25, 1; 1910. (Verwendung von Baryt oder Natronlauge.)

man nicht entfärbt[1] — am einfachsten des von Walpole[2] angegebenen Komparators.

Der Walpolesche Komparator besteht aus zwei Paaren von Glaszylindern mit ebenem Boden, die in einem Gestell paarweise übereinander angeordnet sind, wie aus folgender schematischen Darstellung ersichtlich wird:



Die Lösung B wird unmittelbar, nachdem die Formolmischung zu den 20 ccm Versuchslösung zugesetzt ist, im Komparator fertig titriert, bis in B der gleiche Farbenton erreicht ist wie in A.

Fehlerquellen bei der Formoltitration: Grössere Mengen von α-Prolin und Tyrosin stören, nicht aber Eiweisskörper.

Kleinere Mengen von Ammoniak stören nicht, grössere müssen vor der Formoltitration aus der Lösung durch Destillation mit Baryt unter vermindertem Druck entfernt werden.

Harnstoff und Guanidin sowie Arginin verhalten sich wie neutrale Stoffe.

Zum Verfolgen der Dipeptidspaltung, wo es sich um relative Bestimmungen in der gleichen Reaktionslösung handelt, sind zur Ausführung der Formoltitration keine weiteren Vorbereitungen nötig. Sollen dagegen die Mengen des formoltitrierbaren Stickstoffes absolut bestimmt werden, so muss evtl. anwesende Kohlensäure oder Phosphorsäure zuerst entfernt werden, was nach der von Sörensen gegebenen Vorschrift durch festes Baryumchlorid geschieht.

Clementi[3] hat die Formoltitration als Mikromethode verwendet.

Sörensen hat seine Methode auch zur Verfolgung der enzymatischen Spaltung eigentlicher Proteine verwendet. — Zum Studium der Peptonspaltung haben sich z. B. Rona und Arnheim (Biochem. Zs 57, 84; 1913) dieser Methode bedient.

---

[1] Sörensen und Jessen-Hansen, Biochem. Zs 7, 407; 1907.
[2] Walpole, Biochem. Jl 5, 212; 1910.
[3] Clementi, Atti Acad. dei Lincei (5) 24, II; 1915 und 26, I; 1916. — 29, 327; 1920.

2. Alkalimetrische Titration der Aminosäuren und Peptide nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz[1].

Die Methodik gründet sich darauf, dass das Salz $NH_2 \cdot CH_2 \cdot CO_2K$ in wässriger Lösung eine Base ist (wie Methylamin), in alkoholischer Lösung aber, gleichwie Ammoniak, keine Hydroxyl-Ionen abgibt[2].

Ausführung der Bestimmung: 0,1320 g Glycylglycin = 0,001 Mol. löst man in 5,00 ccm 0,2 Mol. Phosphatpuffer von pH = 7,8 auf und bringt die Lösung durch Zugabe von 0,2 n-Natronlauge, deren Menge (gewöhnlich 1,80 ccm) in einem Vorversuch nach Zugabe des Enzyms ermittelt wird, auf das gewünschte pH von 7,8. Nun setzt man die zu prüfende Enzymlösung hinzu und belässt das auf 10,0 ccm mit Wasser verdünnte Reaktionsgemisch im Thermostaten von 30°. Nach Ablauf der Versuchsdauer unterbricht man die Enzymwirkung durch Eintragen in 130 ccm Methylalkohol und titriert das Verdauungsgemisch nach dem Zusatz von 1,0 ccm 0,5%igem Thymolphthalein + 20 ccm H_2O, also bei einem Methylalkoholgehalt von 85%, mit 0,2 n-90%iger alkoholischer Kalilauge bis zum Auftreten der ersten schwachblauen Indikatorfärbung; bei dieser Reaktion liegt das Phosphat der Pufferlösung als sekundäres Salz vor. Man hat zu jeder Bestimmung eine Leeranalyse auszuführen, deren Alkaliverbrauch von dem des Hauptversuches in Abrechnung zu bringen ist; der verbleibende Aciditätszuwachs entspricht dann der entstandenen Menge Glykokoll.

Störungen der Bestimmungen durch die Anwesenheit anorganischer Salze kommen nach Waldschmidt-Leitz nicht in Betracht.

Die Enzymmenge ist so zu wählen, dass die gemessene Reaktionskonstante zwischen 0,005 und 0,0005 liegt, und die Messung soll nicht über eine 60%ige Hydrolyse des Peptids ausgedehnt werden; für höhere Spaltungsgrade erweist sich nämlich der angewandte Puffer als unzureichend.

Bei der Anwendung dieser Methode auf Peptone ist noch folgendes zu berücksichtigen: Die Polypeptide verhalten sich schon in 40%igem Alkohol wie gewöhnliche Carbonsäuren. Für die Peptone und Proteide gilt gleichfalls, dass schon in sehr verdünntem Alkohol die Endwerte erreicht werden. Die höchsten Alkoholkonzentrationen erfordern die Aminosäuren der aliphatischen Reihe.

3. Bestimmung der Aminogruppen nach van Slyke.

Der Methode liegt bekanntlich die Reaktion zugrunde:

$$R \cdot NH_2 + HNO_2 = R \cdot OH + N_2 + H_2O.$$

Der dabei gebildete Stickstoff wird volumetrisch gemessen.

---

[1] Willstätter und Waldschmidt-Leitz, Chem. Ber. 54, 2988; 1921. — Waldschmidt-Leitz und Schäffner, H. 151, 31 u. zw. 43; 1925.

[2] Zur Titration der Aminosäuren und Polypeptide siehe auch eine gründliche Untersuchung von Harris, Proc. Roy. Soc. B. 95, 440 u. 500; 1923.

Der zur Ausführung der Methode erforderliche Apparat ist in der Fig. 50 schematisch dargestellt. Der Apparat ist zu beiden Seiten des Dreiweghahnes c beweglich aufgehängt. Mit einer Triebwelle kann man abwechselnd sowohl das Desaminierungsgefäss D (in der Nähe des Hahnes d) als auch die Hempelsche Bürette schütteln. Die Triebwelle soll 300—500 Umdrehungen in der Minute machen und wird am besten durch einen kleinen Elektromotor in Gang gesetzt.

Ausführung.

a) Vertreibung der Luft durch Stickoxyd. — Man füllt sowohl die Kapillare g als die Kapillare c von F aus mit Wasser. Den Eisessig lässt man durch a bei offenem Hahn c in D einfliessen, damit die Luft aus D

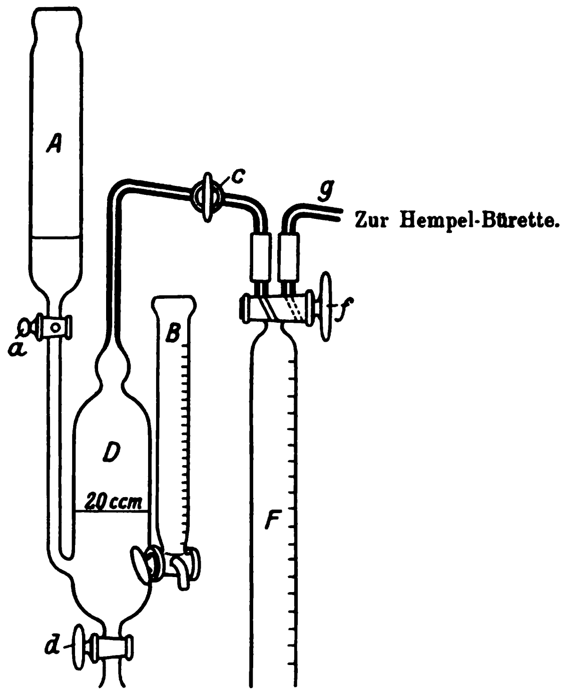


Fig. 50. Apparat nach van Slyke.

entweichen kann. Man füllt dann in A so viel Natriumnitritlösung (30 g Natriumnitrit in 100 ccm Wasser) ein, dass das Gefäss D vollständig und über den Hahn a hinaus gefüllt wird. Das in D entwickelte Gas wird dabei (bei c) eingeschlossen. Während a geöffnet, c geschlossen ist, schüttelt man nun D einige Sekunden lang; dabei sammelt sich sofort Stickoxyd an, das man dann bei c austreten lässt. Hierauf wird das Schütteln wiederholt. Die dabei neu entstandene Menge Stickoxyd, die ebenfalls durch c entweicht, vertreibt die letzten Spuren von Luft. Man schliesst c wieder und schüttelt so lange, bis nur noch 20 ccm Lösung in D zurückbleiben. Dieses Volumen ist durch eine

an D angebrachte Marke angezeigt. Dann schliesst man den Hahn a und stellt bei c und f die Verbindung zwischen D und F her.

b) Einwirkung der salpetrigen Säure auf die Aminosäuren. — Man misst nun etwa 10 ccm der zu analysierenden Lösung im Gefäss B genau ab. Die gewünschte Menge Lösung lässt man dann in das Gefäss D einfliessen, das mit dem Motor in Verbindung steht, und beginnt das Schütteln. Die Reaktion ist meist in 5 Minuten beendet. Nur wenn native Eiweisskörper vorliegen, welche koagulieren, kann es erforderlich sein, länger zu schütteln. Schäumen der Lösung kann durch Octylalkohol gemässigt werden.

c) Absorption des Stickoxyds; Messen des Stickstoffes. — Nach Beendigung der Reaktion werden die Gase in D durch die von A aus eintretende Flüssigkeit nach F getrieben und das Gemisch von Stickstoff und Stickoxyd dann aus F in die Absorptionsbürette übergeführt. Nun wird die Bürette 1 Minute geschüttelt, wobei das Stickoxyd vollständig absorbiert wird. Der reine Stickstoff wird dann in F gemessen. Dabei ist der Hahn a geöffnet, damit während der Bildung von Stickoxyd in D Flüssigkeit aus D entweichen kann.

Prüfung auf Vollständigkeit der Reaktion.

Man treibt den Stickstoff aus F durch c aus; a wird geschlossen und D mit F verbunden. Das Gas, welches in D während der Absorption des Stickoxyds in der salpetrig-sauren Lösung entwickelt wurde, wird ausgeschüttelt, zuerst nach F und dann in die Hempelsche Bürette übergetrieben. Nach Absorption des Stickoxydes sollte das Gasvolumen jetzt nicht mehr als bei einem blinden Versuch, nämlich etwa 0,1 ccm, betragen.

Wenn das Gas vollständig aus D nach F übergetrieben worden ist, lässt man die Lösung der salpetrigen Säure aus D durch den geöffneten Hahn d durch ein Ausflussrohr abfliessen. B wird dann ausgespült und getrocknet.

Bei Verwendung frisch bereiteter Nitritlösungen muss ein Blindversuch gemacht werden, bei welchem man statt der Lösung der Aminosäuren 10 ccm destilliertes Wasser verwendet.

Grössere Mengen Ammoniak stören die Bestimmung; kleinere Mengen sind zulässig. Für genauere Bestimmungen des Aminostickstoffs soll das Ammoniak vorher entfernt werden, was am besten durch Abdestillieren unter Zusatz von Kalk unter vermindertem Druck geschieht.

Bei der Bestimmung von Aminosäuren ist folgendes zu merken:

Wie theoretisch zu erwarten, reagiert der NH_2-Stickstoff der Aminosäuren und Peptide, nicht aber der cyklische Stickstoff; demgemäss liefert Tryptophan die Hälfte, Histidin ein Drittel und Arginin ein Viertel des Stickstoffes.

Komplikationen treten bei den Glycyl-Polypeptiden ein, welche statt 1 Mol. 1,25 Mol. N abgeben.

Zur Berechnung der erhaltenen Volumina hat van Slyke[1] eine Tabelle angegeben, welche am Schlusse dieses Buches mitgeteilt ist.

Mikro-Methode.

Zu Serienbestimmungen ist die Verwendung des van Slykeschen Mikroapparates sehr zweckmässig. Es ist dann nur 1 ccm der zu untersuchenden Lösung erforderlich. Im Mikroapparat fasst die Gasbürette 3 ccm. Der Nullpunkt der Bürette ist statt am Boden des Hahnes in einem Kapillarrohr angebracht und befindet sich einige Millimeter unter dem Hahn.

Andere Methoden als die obigen haben zur Bestimmung des Aminosäuren-Stickstoffes für enzymatische Untersuchungen an Peptiden und Peptonen nicht die gleiche Bedeutung erlangt. Erwähnt sei diejenige von Folin (Jl Biol. Chem. 51, 377; 1922. Reaktion mit α-Naphthochinonmonosulfosäure), die in neuerer Zeit von mehreren Forschern[2] mit Erfolg angewandt wurde.

Früher wurde oft die Zunahme des durch gewisse Reagenzien nicht fällbaren Stickstoffs gemessen.

In diesem Zusammenhang sei auch auf die Enteiweissungs-Methode von Folin und Wu hingewiesen (Jl Biol. Chem. 38, 90; 1919. — 41, 367; 1920).

4. Mikro-Kjeldahl-Methode.

Das Prinzip des Verfahrens besteht darin, dass das nach der Behandlung der stickstoffhaltigen Lösung mit konz. Schwefelsäure + Katalysator gebildete Ammoniak nach dem Alkalisieren durch heissen Wasserdampf in die Vorlage übergeführt und dann jodometrisch bestimmt wird.

Ivar Bang[3], dem man die Ausarbeitung dieser Mikromethode verdankt, hat als ihre besonderen Vorteile hervorgehoben:

1. Die Schnelligkeit der Destillation. 2. Die Reduktion der Fehlerquellen auf ein so geringes, praktisch nicht in Betracht kommendes Mass. 3. Die geringen Korrekturen für den Ammoniakgehalt der Lösung. 4. Nach dem jodometrischen Verfahren können äusserst geringe Mengen Stickstoff mit grosser Genauigkeit bestimmt werden, was auf acidimetrischem Wege nicht in demselben Grade möglich ist.

Ausführung.

Die Lösung des zu analysierenden Stoffes darf etwa 0,02—0,04 mg N enthalten. Man gibt dieselbe in einen etwa 50 ccm fassenden langhalsigen

---

[1] D. D. van Slyke, Jl Biol. Chem. 12, 275; 1912. — Eine Erweiterung auf die Gasdrucke 530—780 hat Sharp berechnet (Jl Biol. Chem. 60, 77; 1924).

[2] Ellinghaus, H. 145, 40; 1925. — Steudel, Ellinghaus und Gottschalk, H. 154, 21; 1926.

[3] Siehe Bang, Mikromethoden zur Blutuntersuchung, 2. Aufl. 1920.

Kjeldahlkolben aus Jenaer Glas und setzt 1 ccm reine konz. Schwefelsäure und ausserdem einige Tropfen 10%iger Kupfersulfatlösung (oder Hg oder stickstofffreies Perhydrol) zu. Man erhitzt über kleiner offener Flamme oder auf dem Drahtnetz anfangs vorsichtig, bis alles Wasser verdampft ist, und dann etwas stärker, bis die Lösung farblos oder (bei Verwendung von Kupfer) rein grün erscheint. Dann lässt man erkalten, setzt etwa 10 ccm Wasser zu, schüttelt etwas um, bis sich eine evtl. gebildete Ausscheidung wieder gelöst hat.

Inzwischen wird der Destillationsapparat durch einen Wasserdampfstrom gereinigt. Dann wird ein kleines Spitzglas von etwa 20 ccm Inhalt mit der erforderlichen Menge (1—5 ccm) 0,005 n-Schwefelsäure unter das Abflussrohr des Apparates gestellt, so dass die Spitze des Rohres in die Schwefelsäure eintaucht.

Der Kjeldahlkolben wird, nachdem er vollständig erkaltet ist, mit dem Destillationsapparat verbunden und durch die bewegliche Stativplatte gestützt. Nun lässt man etwa 3 ccm Natronlauge durch den Trichter einlaufen und stellt die Verbindung zwischen dem Kjeldahlkolben und dem vorher erhitzten Kochkolben her, dessen Wasserinhalt angesäuert ist. (Siedesteine zum Vermeiden des Stossens.) In dem kleinen Silberkühler hat man schon vorher für reichliche Durchströmung mit kaltem Wasser gesorgt. Nun kann der Kochkolben zum lebhaften Sieden gebracht werden. Nach 2—4 Minuten langem Sieden senkt man das Spitzglas, spült das Ende des Abflussrohres mit der Spritzflasche ab und prüft mit Lackmuspapier ob noch Ammoniak übergeht. Ist dies nicht mehr der Fall, so spritzt man das Lackmuspapier in das Spritzglas ab, lässt noch 10 Tropfen übergehen, entfernt den Brenner und unterbricht die Verbindung zwischen Destillationsapparat und Kochkolben.

Das Destillat versetzt man mit 2 ccm 5%iger Jodkaliumlösung (und 2 Tropfen 4%iger Kaliumjodatlösung) und nach einigen Minuten mit 2—3 Tropfen der Stärkelösung. Schliesslich titriert man mit Thiosulfatlösung auf Entfärbung und ergänzt die Titration, wenn im Laufe von 5—10 Minuten ein Nachbläuen eintritt.

Die eigentlichen Proteasen.

Bearbeitet von

Karl Myrbäck.

Einleitung.

Die eigentlichen Proteasen, d. h. die eiweissspaltenden Enzyme sind in der Hinsicht von derselben Wirkung wie die Peptidasen, dass sie Peptidbindungen, — CO — NH —, lösen können. Von den Peptidasen unterscheiden sie sich indessen scharf durch die spezifisch angreifbaren Substrate. Wie nunmehr durch neuere Untersuchungen besonders von Willstätter und Waldschmidt-Leitz gezeigt worden ist, können die Peptidasen (die sog. ereptischen Enzyme) nur einfache Peptide spalten, und umgekehrt gilt, dass die eigentlichen Proteasen in keinem Falle diese einfachen Peptide hydrolysieren können. Die Proteasen greifen dagegen die natürlichen hochmolekularen Eiweissstoffe an, lösen und spalten sie. Dass dabei Aminostickstoff durch Lösung von Peptidbindungen freigemacht wird, ist eine bekannte Tatsache. Möglicherweise werden daneben auch andere Bindungen durch die Proteasen gelöst.

Die Behandlung der proteolytischen Enzyme wird natürlich in höchstem Grade durch die Mannigfaltigkeit und komplizierte Struktur der Substrate erschwert. Bei keinem der angreifbaren Substrate ist der Bau der Moleküle vollständig bekannt, und dazu kommen unter den Substraten die grössten Verschiedenheiten vor, wie z. B. ein Vergleich von Eieralbumin, Gelatine und Casein zeigt. Da indessen diese Substrate und eine Menge anderer von denselben Proteasen mehr oder weniger leicht gespalten werden, müssen wir annehmen, dass die meisten der Bindungen zwischen den verschiedenen Bausteinen ähnlich sind. Zu diesem Resultat ist man ja auch auf rein chemischem Wege schon viel früher gelangt. Die klassischen Untersuchungen Emil Fischers und anderer über die Struktur der Eiweissstoffe gipfelten in der Anschauung, dass die Eiweissstoffe im wesentlichen hochmolekulare Polypeptide sind. Indessen muss daran erinnert werden, dass Emil Fischer in seinem bekannten Vortrag (Chem. Ber. 39) schon 1906 schrieb: „Ich möchte aber hier darauf aufmerksam machen, dass die einfache Amidbildung nicht die einzige

Möglichkeit der Verkupplung im Proteinmolekül ist. Im Gegenteil, ich halte es sogar für recht wahrscheinlich, dass einerseits Piperazinringe dort vorkommen, deren leichte Sprengung durch Alkali und Rückbildung aus den Dipeptiden oder ihrer Estern ich so häufig bei den künstlichen Produkten beobachtet habe, und dass andererseits die zahlreichen Hydroxyle der Oxyaminosäuren keineswegs indifferente Gruppen im Proteinmolekül sind." Der Hauptsache nach wäre aber, wie gesagt, das Eiweissmolekül eine offene Kette von peptidartig verknüpften Aminosäuren. Auf Grund dieser Anschauung ist es durchaus verständlich, dass dieselben Enzyme die Spaltung von mehreren scheinbar ganz verschiedenartigen Eiweissstoffen durchführen können. Dagegen ist es wohl schwerer zu verstehen, dass nur die Länge der Kette die absolute Spezifität der Proteasen und der Peptidasen bedingen sollte.

In der letzten Zeit ist indessen von verschiedenen Seiten die Auffassung über den Bau der Eiweisskörper wieder modifiziert worden. Man ist darüber einig, dass im grossen und ganzen das Eiweiss aus Aminosäuren aufgebaut ist. Über die Art der Verknüpfung dieser Bausteine bestehen dagegen verschiedene Meinungen. Während man früher annahm, dass alle Aminosäuren in derselben Weise durch einfache Peptidbindungen vereinigt seien, muss man wohl heute gestehen, dass sich die experimentellen Stützen für das Vorkommen anderer Bindungsarten gemehrt haben. Schon im 16. Kapitel wurde die Existenz von aus Aminosäuren aufgebauten Ringgebilden im Eiweiss erwähnt. So wurde in einer Reihe von Untersuchungen, neuerdings besonders von Abderhalden und Mitarbeitern, wieder an die von E. Fischer in Betracht gezogenen Diketopiperazinringe erinnert, und weiterhin wahrscheinlich gemacht, dass in einigen Eiweissstoffen Diketopiperazinringe vorkommen. Bei der Hydrolyse mit Säure oder Alkali werden diese Ringe aufgespalten und die Bausteine als Aminosäuren wiedergefunden. Durch Fermente hat man bisher keine Diketopiperazine spalten können. Da solche Ringe nur in einigen Eiweissen vorzukommen scheinen, ist es wohl denkbar, dass sie zu der grossen Resistenz einiger Eiweisskörper gegen Enzymangriff beitragen können. Da es auch in keinem Falle gelungen ist, die enzymatischen Hydrolyseprodukte eines Eiweisses in annähernd theoretischer Ausbeute zu isolieren, ist es wohl möglich, dass unter diesen in einigen Fällen Spaltstücke vorkommen, welche Diketopiperazinringe besitzen.

Dass also wenigstens in einigen Proteinen vereinzelte Anhydridkomplexe vorkommen, ist sicher, und das Verhalten dieser Körper bei der Säure-, Alkali- oder Enzymhydrolyse zu erklären, bietet keine Schwierigkeiten. Indessen sind in den letzten Jahren ganz neuartige Vermutungen über die Struktur der Eiweisskörper von verschiedenen Seiten ausgesprochen worden. In diesen Theorien sind die Ringgebilde in den Eiweissen die wesentlichen Struktureinheiten. Die Richtigkeit der alten Anschauung, dass die natür-

lichen Eiweissstoffe enorme, von peptidartig zusammenhängenden Aminosäuren gebildete Ketten haben, ist durch einige neue Untersuchungen in Frage gestellt worden. Wie Troensegaard und Schmidt[1] fanden, erhält man für die Molekulargewichte, wenn sie durch die Gefrierpunktserniedrigung in Phenol bestimmt sind, ganz kleine Werte[2]. Für Gelatine und Phenol fanden sie das Molekulargewicht 350 und für Gliadin 440. Durch seine Untersuchungen über die Proteine wird Troensegaard zu einer neuen Auffassung von deren Konstitution geführt. Er hebt hervor, dass sich die klassische Auffassung ausschliesslich auf die Untersuchungen der hydrolytischen Spaltprodukte gründet, und zwar hat es besonders die Aufmerksamkeit erregt, dass die Aminosäuren, die man bei der Säurehydrolyse erhält, auch nach der enzymatischen Hydrolyse isoliert werden können. Die Ausbeuten an definierten Hydrolyseprodukten sind in beiden Fällen recht schlecht. Troensegaard meint, dass wenn man nicht mehr als etwa 30% des Stickstoffes bei Hydrolyse von Serumprotein in Gestalt von definierten Abbauprodukten hat fassen können, so ist dies nicht eine genügende Basis für die Behauptung, dass dieses Protein aus α-Aminosäuren aufgebaut ist. Weiter ist nach Troensegaard noch nicht genügend untersucht, ob die Proteasen, die nach der klassischen Auffassung ausschliesslich Peptidbindungen lösen sollen, nicht auch andere NH-CO-Konstellationen zu spalten vermögen. Man muss Troensegaard darin beistimmen, dass es zu einseitig ist, nur die verschiedenen Hydrolysen der Eiweissstoffe zu studieren. Auf Grund von Versuchen, bei denen ganz neue Spaltungsmethoden geprüft wurden, kam Troensegaard zu der Auffassung, dass die Proteine in der Hauptsache aus heterocyklischen Ringen aufgebaut sind, welche durch Säuren, Laugen und Proteasen leicht aufgespalten werden können, und zwar nimmt er an, dass der Sauerstoff der Proteine zum grössten Teil in den heterocyklischen Ringen als Hydroxyl vorkommt. Solcher Sauerstoff verursacht eine leichte Aufspaltung der Ringe.

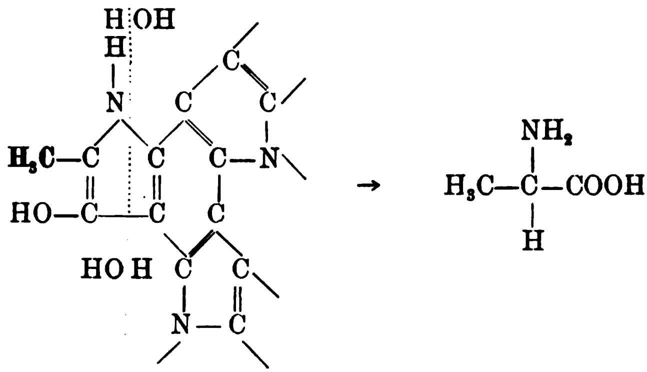
Heterocyklische Ringe in Eiweiss hat man schon früher gefunden. Kossel fand Histidin, Fischer fand Prolin und Oxyprolin, Hopkins fand Tryptophan.

Mit dem Umstande, dass doch in der Mehrzahl der Fälle die aliphatischen Aminosäuren die Hauptmenge der Spaltprodukte ausmachen, kommt Troensegaard zurecht, indem er annimmt, dass in den Eiweissen zwischen den Pyrrolringen eine Bildung von anderen cyklischen oder heterocyklischen Ringen vorkommt. Als Beispiel führt er eine Formel an:

---

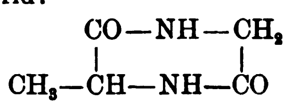
[1] Siehe Troensegaard, H. 112, 86; 1920; 127, 137; 1923; 130, 84; 1923; 133, 116; 1924.

[2] Die Deutung dieser Werte ist noch unsicher. Bemerkenswerte Beiträge zur Frage nach dem Molekulargewicht von Proteinen haben neuerdings E. J. Cohn und Mitarbeiter geliefert. Siehe Cohn, Hendry und Prentiss, Jl Biol. Chem. 68, 721; 1925. — Cohn, Jl Gen. Physiol. 4 u. 5. — Cohn und Conant, H. 159, 93; 1926. — Über Molekulargewichtsbestimmungen durch Zentrifugierung siehe The Svedberg, Zs f. physikal. Chem. 121, 65; 1926.



Aus diesem Ringsystem kann man sich, wie in der Figur angedeutet, Alanin abgespalten denken. „Ist der Komplex an der hervorgehobenen Methylgruppe durch eine aliphatische Kette mit einem anderen Komplex verbunden, so kann man sich hieraus die Bildung anderer homologer Aminosäuren denken. Ebenso kann man sich die Bildung von Tryptophan und der Aminosäuren Phenyl- und Oxyphenylalanin durch die Annahme ähnlicher hypothetischer Formeln erklären."

Ungefähr gleichzeitig mit Troensegaard hat Herzog[1] gezeigt, dass man bei der Molekulargewichtsbestimmung von Seidenfibroin in Resorcin sehr niedrige Werte erhält. Weiter haben Herzog und Mitarbeiter durch Aufnahme von Röntgenspektrogrammen bei einigen Eiweissstoffen Gitterstrukturen festgestellt, die nicht gut mit der Annahme von Riesenmolekylen zu vereinen sind. So konnte Brill[2] im Falle von Seidenfibroin wahrscheinlich machen, dass das „Molekül" aus periodisch wiederkehrenden Grundkörpern aufgebaut ist, und zwar sollen diese Grundkörper in diesem Falle aus Glycyl-d-Alaninanhydrid:



bestehen.

Diese Anschauung, dass die Eiweissstoffe aus mehr gleichartigen „Elementarkomplexen" aufgebaut sind, tritt in der letzten Zeit in den Vordergrund. Die Vereinigung dieser Elementarkomplexe soll von sehr loser Art sein. Entweder nimmt man eine „rein physikalische Aggregation" an, wobei der Mechanismus der Bindung durchaus unklar bleibt, oder man sucht die Ursache zu dem Zusammenhalten in Nebenvalenzen.

Wenn die Diketopiperazine, die nach Abderhalden tatsächlich in den Proteinen vorkommen, das typische Strukturelement derselben bilden, und also besonders im Seidenfibroin ausschliesslich die Struktur bedingen sollen, so kann es auffallen, dass Fischer und Abderhalden aus diesem Protein

[1] Herzog und Kobel, H. 134, 296; 1924.

[2] Brill, Liebigs Annalen, 434, 204, 1923. Siehe auch Herzog, Naturw. 11, 180; 1923.

ein Tetrapeptid isolieren konnten, in dem auch Tyrosin vorkam. Abderhalden nimmt nun, um dies und ähnliche Verhältnisse zu erklären, an, dass die Elementarkörper des Eiweisses Diketopiperazine sind, die mit Aminosäuren und vielleicht auch mit Peptiden verbunden sein können.

Gegen alles dies spricht indessen der Umstand, dass Diketopiperazine sowohl gegen Enzyme wie gegen die im Verdauungskanal vorkommenden Aciditäten vollkommen widerstandsfähig sind. Neue Versuche hierüber liegen von Waldschmidt-Leitz und Schäffner[1] vor. Ferner muss man gestehen, dass die bekannten Diketopiperazine in keinen Eigenschaften den Eiweissstoffen ähnlich sind. Auch zeigen sie keine Neigung zur Polymerisation. Hier sind nun die Untersuchungen von M. Bergmann von grösstem Interesse[2]. Er konnte zuerst zeigen, dass man durch Umlagerung Piperazine erhalten kann, die in der Zusammensetzung usw. nicht von den gewöhnlichen abweichen, die aber eine ausgesprochene Neigung zur Polymerisation haben. Weiter konnte er zeigen, dass man durch gewisse Operationen aus diesen polymeren Körpern Tetrapeptide erhalten kann. Somit kann der Umstand, dass Tetrapeptide als Spaltprodukte der Proteine auftreten, nicht als ein Beweis gegen die Piperazinstruktur des Eiweisses angeführt werden. Die polymeren Produkte Bergmanns waren in manchen Hinsichten den natürlichen Proteinen ähnlich. Über das Verhalten dieser Theorie zu den Ergebnissen der Enzymforschung sagt Bergmann: „Auch der Einwand, dass Diketopiperazine gegen alle proteolytischen Fermente indifferent sind, wird entkräftet; denn es kommt nun ein Aufbau der Proteine aus Isomeren der echten Diketopiperazine in Frage, deren Abbau durchaus nicht über die echten Diketopiperazine zu gehen braucht. Man könnte sich sehr wohl vorstellen, dass auch bei der Fermentwirkung zunächst, ganz wie bei unseren Salzsäurehydrolysen, wenigstens teilweise ein Zerschlagen des übermolekularen Gebildes in Polypeptide erfolgt, die dann durch einen anderen Fermentkomplex zu den einzelnen Aminosäuren aufgeteilt werden. So würde das ganz verschiedene Verhalten unserer Kunstprodukte in saurer und alkalischer Lösung auch einen Fingerzeig für die verschiedene Wirkungsweise saurer und alkalischer proteolytischer Fermente abgeben.“

Wohl sind die bisher angewandten Methoden der Eiweisshydrolyse zu einseitig gerichtet gewesen; andererseits geht aber Troensegaard zu weit, wenn er schreibt[3]: „Wir schliessen . . . . . ., dass die alte Methode der Spaltung der Proteine mit starker, kochender Salzsäure und auch mit Fermenten zu gewaltsam ist, um die wirklichen Bausteine derselben zu

[1] Waldschmidt-Leitz und Schäffner, Ber. d. D. chem. Ges. 58, 1356; 1925.

[2] Max Bergmann, Lieb. Ann. 445, 1, 1925. — Siehe auch Naturwiss 12, 1155; 1924. — Zur Literatur und zu den divergierenden Prioritätsansprüchen siehe ferner: Abderhalden, Naturwiss. 12, 716; 1924 u. H. 142, 311; 1925. — M. Bergmann, H. 144, 276; 1925. — R. O. Herzog, H. 141, 158; 1924.

[3] Troensegaard, H. 133, 117; 1924.

liefern.“ Vielmehr geht aus den Untersuchungen der letzten Zeit über die Enzymproteolyse hervor, dass gerade die Proteasen für die allerfeinsten Strukturunterschiede empfindlich sind, und dass die Untersuchung der enzymatischen Eiweissspaltung durch einheitliche und hochwirksame Enzympräparate geeignet ist, zur Aufklärung der Konstitution der Proteine beizutragen.

Die Auffassung, dass die sogenannten Elementarkomplexe des Eiweisses nur durch physikalische Kräfte oder Nebenvalenze zusammengehalten werden, und dass also die Wirkung der Proteasen nur in einer Lösung der Aggregation bestehen sollte, wird von verschiedenen Seiten ausgesprochen. Damit ist indessen der Befund absolut unvereinbar, dass bei der Wirkung aller Proteasen, auch der enzymatisch einheitlichen Stoffe, welche einfache Peptide nicht spalten, eine Zunahme von Carboxyl- und Aminogruppen stattfindet[1]. Eine Lösung von Bindungen — CO–NH — tritt also bei der enzymatischen Proteolyse unmittelbar ein, und zwar auch bei Enzymen, die nach der obengeschilderten Auffassung nur desaggregierend wirken sollen. Oppenheimer z. B. sieht in dem echten Pepsin ein Enzym, das nur die losen Bindungen zwischen den Elementarkörpern lösen soll. Wie sich diese Auffassung mit dem Umstand vereinbaren lässt, dass bei der Pepsinwirkung nach Henriquez und Gjaldbäk bis zu 39% vom Totalstickstoff als Aminostickstoff freigesetzt wird, ist schwer zu verstehen.

In seinen letzten Arbeiten hebt auch Willstätter[2] hervor, dass nach seinen Versuchen über die Enzymproteolyse die Messung des Carboxylzuwachses ein richtiges Mass für den wesentlichen Vorgang der Proteolyse ist. Seine Erfahrungen stehen mit der älteren Anschauung in Einklang, der zufolge der Abbau der Eiweisskörper im wesentlichen in der Auflösung von Peptidbindungen besteht, und sie sprechen gegen die seit kurzem in den Vordergrund getretene neue Annahme, wonach die Proteolyse in einem wesentlichen Teile ein Vorgang der Desaggregation polymerer Komplexe sein soll. Sicher ist, dass man durch Messung des Zuwachses an Carboxyl- bzw. Aminogruppen die proteolytische Wirkung der Enzyme exakt bestimmen kann. Da wir nunmehr, besonders durch die Arbeiten von Willstätter und seinen Mitarbeitern in der Lage sind, die Spaltung der Proteine durch einheitliche Enzyme zu studieren, können wir hoffen, durch Untersuchungen über die enzymatische Spaltung, deren Verlauf und Produkte, entscheidende Ergebnisse über die Konstitution des Eiweisses zu erhalten. Denn sicher ist, dass wir in den Enzymen Reagenzien haben, die gegen feine Konstitutionsunterschiede so empfindlich sind wie keine anderen.

Äusserst interessant ist in dieser Hinsicht eine neu erschienene Arbeit

[1] Siehe Waldschmidt-Leitz und Schäffner, H. 151, 31; 1926.

[2] Willstätter, Grassmann und Ambros, H. 152, 157; 1926. — Siehe auch Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 149, 203; 1925.

von Waldschmidt-Leitz, Schäffner und Grassmann[1]. Die Verfasser haben die enzymatische Spaltung des Clupeins, dessen Zusammensetzung dank Kossels Arbeiten recht gut bekannt ist, untersucht. Ihre Versuche mit den einheitlichen Enzymen Trypsin, Trypsin-Kinase und Darmerepsin, die in Kombinationen wechselnder Reihenfolge vorgenommen wurden, geben nicht nur ein anschauliches Bild von den Spezifitätsveränderungen der Enzyme, sondern auch Einblicke in die Konstitution der Substrates. Beispiel:

Reihenfolge der Enzyme	Zuwachs (ccm 0,2 n-Lauge)		Leistung	Leistungs-verhältnis
	COOH	NH_2		
Trypsin	0,90	0,90	1,0	1:3:1
Trypsin-Kinase	2,67	2,86	3,0	
Darmerepsin	0.94	0.96	1,0	
	4,51	4,22	5,0	
Trypsin	0,92	0,92	1,0	1:1:1:2
Darmerepsin	0,93	0,98	1,0	
Trypsin-Kinase	0,89	0,83	1,0	
Darmerepsin	1,70	1,58	1,9	
	4,44	4,31	4,9	
Trypsin-Kinase	3,13	3,15	3,5	2:1
Darmerepsin	1,53	1,72	1,7	
	4,66	4,87	5,2	
Trypsin	0,92	0,96	1,0	
Hefeerepsin	0,08	0,12	—	

In dieser Tabelle kommt die bedeutsame Tatsache zum Ausdruck, dass die Wirkungen der einzelnen Enzyme nach einer jeweils bestimmten Leistung zum Stillstand kommt und dass die Leistungen, durch die Bildung chemisch fassbarer Gruppen gekennzeichnet, in einfachen ganzzahligen Verhältnissen zueinander stehen. Unter den enzymatisch lösbaren Bindungen des Clupeinmoleküls kann man Gruppen unterscheiden, die sich mit Bruchteilen von Fünfteln und Dritteln des hydrolytischen Gesamtvorganges beteiligen. Dieselben Resultate wurden auch mit Papain und Papain-HCN erhalten. Wichtig ist, dass der Gesamtbetrag der freigesetzten sauren und basischen Gruppen identisch ist und mit dem von Rogozinski bei der Säurehydrolyse des Clupeins erhaltenen Wert übereinstimmt. Die ganze enzymatische Hydrolyse des Clupeins besteht in der Lösung von Peptidbindungen. Die Annahmen von Troensegaard über die sekundäre Bildung der Aminosäuren findet in diesen Versuchen im Fall von Clupein keine Stützen, ebensowenig die Theorien über den Aufbau der Proteine aus Diketopiperazinringen.

[1] Waldschmidt-Leitz, Schäffner und Grassmann, H. 156, 68; 1926. — Siehe auch Waldschmidt-Leitz und Simons, Über die enzymatische Hydrolyse des Caseins, H. 156, 99; 1926.

Einteilung der eigentlichen Proteasen.

Nachdem in den Kapiteln 16 und 17 diejenigen Enzymwirkungen behandelt worden sind, welche sich auf niedere Peptide und Peptone beziehen, bleibt nun für die folgende Darstellung eine Systematik zu wählen. Erst in allerletzter Zeit sind durch die Arbeiten der Schule Willstätters[1], besonders durch die Veröffentlichungen von Waldschmidt-Leitz, Tatsachen und Beziehungen bekannt geworden, welche geeignet sind, den Grund zu einer solchen Systematik zu legen. Zur endgültigen Ausarbeitung einer Einteilung der Proteasen reicht aber das bekannt gewordene Versuchsmaterial noch nicht hin, und wir haben deshalb in den zahlreichen Fällen, in denen über Zusammengehörigkeit von Enzymen noch keine ausreichenden experimentellen Unterlagen vorhanden waren, Abgrenzungen überhaupt nicht vorgenommen, um nicht der Forschung vorzugreifen.

Fest steht auch nach den neuesten Ergebnissen die alte Einteilung zwischen

1. Trypsin und
2. Pepsin.

Was die tryptischen Enzyme betrifft, so sprach vieles dafür, dieselben im Anschluss an Waldschmidt-Leitz[2] in zwei Gruppen zusammenzufassen und

die Enzyme vom Typus des nicht aktivierten Trypsins
dem System Trypsin + Co-Trypsin (Enterokinase)

gegenüberzustellen.

Wir halten es gegenwärtig sogar für wahrscheinlich, dass eine solche Einteilung sich in einiger Zeit als sehr zweckmässig erweisen wird. Gegenwärtig erschien es uns noch zu schwierig zu entscheiden, welche Enzymwirkungen der einen oder der anderen Gruppe angehören, und wir haben uns also damit begnügen müssen, die an verschiedenem Enzymmaterial gewonnenen Tatsachen nebeneinander zu ordnen.

[1] Siehe Willstätter, Deutsche Med. Woch. 1926, Nr. 1.
[2] Waldschmidt-Leitz und A. Harteneck, H. 149, 203 u. zw. 211; 1925.

18. Kapitel.

Tryptase.

Die eiweissverdauende Wirkung des von der Pankreasdrüse abgesonderten Saftes wurde schon vor etwa hundert Jahren entdeckt (Purkinje; Pappenheim, 1836). Eine wesentliche Förderung erfuhr das Studium des proteolytischen Pankreasenzymes, als die Gewinnung von Pankreassaft durch Fisteln möglich wurde.

Kühne[1] stellte fest, dass bei der Einwirkung des Pankreasferments, des Trypsins, auf Eiweiss nicht nur Peptone und Albumosen entstehen. Er konnte nämlich die Anwesenheit von Leucin und Tyrosin im Gemisch der Verdauungsprodukte zeigen. Diesen Versuchen, die seitdem in mannigfaltigen Richtungen bestätigt und erweitert worden sind, entstammt die bis in die letzte Zeit oft vertretene Ansicht, das Pankreastrypsin sei ein Enzym, das die vollständige Spaltung des Eiweisses in Aminosäuren bewerkstelligen kann. Die andere mögliche Annahme, dass das Pankreasenzym wenigstens zwei Enzyme, eine Protease und eine Peptidase, enthält, hat sich in der letzten Zeit durch die bedeutungsvollen Untersuchungen von Willstätter und von Waldschmidt-Leitz als die richtige erwiesen[2]. Es gibt in dem Pankreas ein proteolytisches Enzym, das die genuinen Eiweissstoffe angreift und wie das Pepsin sie in niedrige Peptide überführt. Dieses Enzym kann wie das Pepsin unter keinen Umständen die Spaltung der Peptide beschleunigen, vielmehr greift hier das andere Enzym, die Peptidase ein, durch deren Wirkung die Hauptmenge der Aminosäuren entsteht. Bei der Eiweissspaltung durch erepsinfreies Trypsin entstehen auch kleine Mengen Aminosäuren, die indessen, nicht durch Peptidspaltung gebildet worden sind. Das erstgenannte Enzym die eigentliche Protease, nennen wir Tryptase. (Derselben Nomenklatur hat sich auch Oppenheimer angeschlossen.) Der alte Name Trypsin soll dagegen auch künftig das aus dem Pankreas erhaltene natürliche Enzymgemisch bezeichnen. Dieser Vorschlag ist den früher bei Invertin, Emulsin usw. gemachten[3] analog.

Durch die Arbeiten von Waldschmidt-Leitz ist gezeigt worden, dass durch die Wirkung auch der, soweit wir wissen, enzymatisch einheitlichen Tryptase (peptidasenfrei) aus den Proteinen Aminosäuren entstehen. Diese stammen aber nicht aus Peptiden, sondern werden in einer noch nicht klargelegten Weise direkt abgespalten (vor allem durch kinaseaktivierte Tryptase).

[1] Kühne, Virchows Archiv 39, 130; 1867.
[2] Siehe z. B. Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 149, 203; 1925.
[3] Euler und Josephson, Chem. Ber. 56, 453; 1923.

Ist nun die Tryptase als einfaches Enzym von den übrigen im Pankreassaft vorkommenden abgegrenzt worden, und keine zuverlässigen Versuche sprechen dafür, dass daselbst mehrere proteolytische Enzyme zu finden sind, so erhebt sich die Frage, inwieweit die bei verschiedenen Tieren wirksamen Tryptasen identisch sind. Werden schon hier die Verhältnisse recht kompliziert, so werden sie dadurch nicht einfacher, dass die Pankreastryptase im frisch abgesonderten Zustande wenigstens gegenüber gewissen Substraten inaktiv ist und erst durch die Einwirkung eines Aktivators, der Enterokinase oder Co-Tryptase, wirksam wird. Noch merkwürdiger ist, wie die letzten Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz gezeigt haben, dass der Aktivator in diesem Falle nicht nur wie gewöhnlich die Spaltungsgeschwindigkeit der durch das nichtaktivierte Enzym spaltbaren Substrate erhöht, sondern dass er auch den Wirkungsbereich des Enzyms in der Hinsicht erweitert, dass das aktivierte Enzym auch Substrate spaltet, die durch das nicht aktivierte Enzym gar nicht angegriffen werden. Durch die letzten Untersuchungen über die Pankreasenzyme wird ein ganz neues Licht über viele ältere Untersuchungen geworfen; wie wir nunmehr erkennen, ist die Mehrzahl der alten Arbeiten so angestellt, dass aus ihnen Schlüsse nur mit der grössten Vorsicht gezogen werden dürfen.

Die Tryptase ist also das eigentliche proteolytische Enzym, das im Pankreas der Tiere und vielleicht auch in anderen Organen vorkommt, und das seine optimale Wirkung in schwach alkalischer Lösung entfaltet. Obgleich auch hier wie beim Pepsin das pH-Optimum bei Anwendung verschiedener Substrate wohl nicht ganz dasselbe ist, so dürfte als ein Mittelwert pH = 8 angegeben werden können.

Bei allen Tieren, wo pankreatisches Gewebe, sei es in Form einer wahren Drüse sei es in anderen Geweben oder Organen eingelagert, vorkommt, ist die Tryptase beobachtet worden. Versuche, welche die Annahme von mehreren Tryptasen scheinbar stützen, sind entweder mit einer nicht einwandfreien Methodik ausgeführt oder es sind Enzympräparate zur Anwendung gekommen, die z. B. durch Gewebspepsinasen verunreinigt sind; pH war nicht gemessen worden, und die verschiedenen Wirkungen auf verschiedene Substrate sind nicht berücksichtigt, da sie nicht bekannt waren. So dürfte die von Pollak[1] angenommene Glutinase zu erklären sein[2], ebenso die sehr umstrittene Casease. Möglicherweise spielt hier die verschiedene Angreifbarkeit der Substrate durch mehr oder weniger aktiviertes Enzym mit.

A. Substrate.

Die aktivierte Tryptase greift die meisten Eiweissstoffe an, einige jedenfalls sehr langsam. Casein, Fibrin und Glutin werden besonders leicht ge-

[1] Pollak, Hofm. Beitr. 6, 95; 1905.
[2] Ehrenreich (1905). — Ascoli und Neppi, H. 56, 135; 1908.

spalten[1], Kollagen und Elastin[2] dagegen nur schwer. Besonders bemerkenswert ist die Resistenz des Serumalbumins, wenn sie auch nicht vollständig ist[3]. Über die Hemmung durch Serumalbumin bzw. über dessen antitryptische Wirkung hat Hedin mehrere Untersuchungen veröffentlicht. Die antitryptische Wirkung soll auf einer irreversibeln Verfestigung des Enzyms am Albumin beruhen. Dagegen wurde die Hemmung z. B. der Caseinverdauung durch zugesetzte grössere Mengen von Serumalbumin auf eine reversible „Ablenkung" des Enzyms zurückgeführt. Diese Ablenkung tritt auch z. B. durch die Verdauungsprodukte ein[4], und nach Hussey und Northrop ist die Hemmung unter Anwendung der gewöhnlichen Gleichgewichtsgleichungen berechenbar[5]. Siehe weiter unter „Antitrypsin".

Da über die Konstitution der Proteine nur wenig Sicheres bekannt ist, kann man zur Zeit nicht näher angeben, welche Bindungen durch Trypsin gelöst werden. Interessant ist, dass eine sehr leichte Vorverdauung der von Tryptase nur schwer angreifbaren Eiweissstoffe mit Pepsin eine sehr glatte Trypsinverdauung bedingt. Man dürfte der Auffassung beipflichten können, dass für die Aufspaltung des höher molekularen Eiweisses in die Aminosäuren alle drei in dem Verdauungskanal vorkommenden proteolytischen Enzyme absolut notwendig sind:

Das Pepsin teilt die Proteine leicht aber nicht weitgehend auf. Dabei entstehen recht hochmolekulare Produkte, die Peptone im weiteren Sinne.

Die Tryptase spaltet leicht die Peptone, kann auch gewisse Eiweissstoffe angreifen und wenigstens teilweise spalten. Reaktionsprodukte sind Peptide und kleinere Mengen von Aminosäuren. Das Erepsin enthält im wesentlichen Peptidase, welche nur Peptide angreift und sie in Aminosäuren spaltet.

Die strenge Spezifität der Proteasen zwingt, wie Waldschmidt-Leitz hervorhebt, zu einer rein chemischen Auffassung der Struktur der Proteine. Die Wirkung der eigentlichen Proteasen kann nicht als eine „Desaggregierung" aufgefasst werden. Richtig bleibt natürlich, dass die durch diese Enzyme bedingte chemische Veränderung der Substrate von sehr leicht wahrnehmbaren physikalischen Veränderungen begleitet ist (Viscosität, Oberflächenspannung usw.).

Wie nun die neuen Auffassungen über die Struktur der Proteine, die auf präparativ-chemischem Wege gewonnen sind, mit den Ergebnissen der Enzymchemie in Übereinstimmung zu bringen sind, darüber kann vorläufig nur wenig gesagt werden. Die von Troensegaard, Abderhalden,

---

[1] Daraus die Angaben, dass Casein von Peptidasen spaltbar sein sollte. Vgl. Levene, H. 41, 8, 99; 1904.

[2] Abderhalden, H. 71, 315.

[3] Oppenheimer und Aron, Hofm. Beitr. 4, 279; 1904. — Oppenheimer, ebenda 4, 259; 1904.

[4] Hedin, H. 52. 412; 1907.

[5] Hussey und Northrop, Jl of gen. Physiol. 5, 335; 1923.

Herzog, Bergmann u. a. begründeten Annahmen über das Vorkommen von Ringstrukturen (heterocyklischen Ringen, Diketopiperazinen) in Eiweiss kann möglicherweise die verschiedene Spaltbarkeit der Proteine insofern erklären, als nach allen einschlägigen Arbeiten diese Ringe von den proteolytischen Enzymen nicht gelöst werden. Da die Diketopiperazine nach Abderhalden eigentlich nur in gewissen Eiweissstoffen vorkommen sollen, kann dies die auffallende Resistenz dieser Stoffe, man denke z. B. an das Seidenfibroin, vielleicht erklären.

Augenblicklich liegt kein Anlass vor, die Proteasen wegen der Besonderheiten ihrer Substrate als in ihrer Wirkung von den anderen Enzymen wesensverschieden anzusehen. Vielmehr wird auch hier immer deutlicher, dass sich die Reaktionen nach den bekannten chemischen Gesetzen beschreiben lassen, und dass mit den bei anderen Enzymreaktionen schon geläufigen Begriffen und Konstanten (Affinitätskonstanten der Verbindungen Enzym-Substrat und Enzym-Reaktionsprodukten usw.) auch hier gearbeitet werden kann.

B. Ausgangsmaterial und dessen Behandlung (Reinigung).

Als Ausgangsmaterial für Reinigungsversuche im grösseren Massstabe kann der Fistelsaft nicht dienen, da dessen Gewinnung in grösseren Mengen mit allzu grossen Schwierigkeiten verbunden ist. Statt dessen wird nunmehr direkt von der Drüse ausgegangen. Aus frischer, von Fett usw. möglichst befreiter Drüsensubstanz kann die Extraktion sowohl mit Glycerin als mit Wasser geschehen. Die Glycerinlösungen sind sehr haltbar. Um ein gleichmässiges haltbares Ausgangsmaterial zu bekommen, das für die Reinigungsarbeiten dienen kann, wird am besten die Drüse getrocknet. Die Methode wird geeignet an einem Beispiel erläutert, das einer Arbeit von Willstätter und Waldschmidt-Leitz[1] entnommen ist:

16,5 kg frische Pankreasdrüsen vom Schwein werden von Fett und Bindegewebe befreit. Gewicht danach 14,9 kg. Nach gründlicher Zerkleinerung in der Fleischhackmaschine wird der Drüsenbrei in kleineren Portionen mit Aceton gut vermischt, in grosse Flaschen übergespült, so dass schliesslich die ganze Drüsenmasse mit 30 Liter Aceton versetzt worden ist. Nach 1—2 stündigem Stehen wird filtriert und die Masse nochmals mit 30 Liter Aceton in derselben Weise behandelt. Danach kommt eine Behandlung mit 15 Liter Aceton + 15 Liter Äther. Schliesslich wird das Drüsenpulver zweimal mit je 30 Liter Äther gewaschen. Das körnige Material wird dünn ausgebreitet auf Filtrierpapier an der Luft getrocknet. Das trockene Pulver wird mehrmals gemahlen und gesiebt. Erhalten wurde 1,65 kg staubfeines Pulver und 0,68 kg grobfaseriger Anteil. Beide sind wirksam.

Längeres Stehen des Drüsenpräparats mit Alkohol ist zu vermeiden.

[1] Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 125, 132; 1925.

Die Drüse wie das Trockenpräparat enthält ausser Tryptase auch Lipase, Amylase, Peptidase, Kinase und deren Vorstufe. (Möglich ist, dass die Prokinase nichts anderes ist als Kinase + Hemmungskörper.) Die Aufgabe der Reinigungsarbeit ist nun erstens die Abtrennung der enzymatischen Verunreinigungen, zweitens die Steigerung des Reinheitsgrades des enzymatisch einheitlichen Trypsins.

1. Löslichkeit. Ältere Beobachtungen über Sorption.

Das unreine Trypsin ist in Wasser und Glycerin-Wassergemischen löslich. In reinem Glycerin soll es unlöslich sein. In 40%igem Alkohol ist es nach Dastre[1] löslich. Höhere Alkoholkonzentrationen fällen, wobei je nach der Schnelligkeit der Operation mehr oder weniger Enzym zerstört wird.

Die Fällung mit Safranin[2] ist wohl hier wie bei Pepsin als eine Sorption zu betrachten.

Die alten Angaben, das Trypsin sei ein Nukleoproteid, sind so zu deuten, dass sich das Enzym in den Drüsenauszügen bzw. in dem Pankreassaft in einer Verbindung mit einem Nucleoproteid bzw. an einem solchen sorbiert vorfindet.

Die Anschauung von Herzfeld und Klinger[3], das Trypsin sei nichts anderes als ein durch einen besonderen kolloiden Zustand ausgezeichnetes Gemisch von Eiweissabbauprodukten, entbehrt der soliden Grundlage.

Über Sorption des Trypsins an Filtrierpapier liegen Versuche von Tsou-Hia-Hsü[4] vor.

Über die Sorption des Trypsins an Kohle und die Elution desselben hat Hedin[5] Versuche angestellt. Er zeigte zuerst, dass Trypsin von Kohle sehr leicht aufgenommen wurde. Wurde die Kohle abfiltriert, so besass die Flüssigkeit keine tryptische Wirkung. Wurde indessen die Kohle in eine Caseinlösung gebracht, so trat Spaltung ein, was darauf beruhte, dass das Enzym teilweise ausgelöst wurde. Die Elution erfordert eine gewisse Zeit[6] und der ausgelöste Teil wird mit steigender Temperatur vergrössert. Bei kleinen Caseinmengen steigt die Elutionsausbeute mit der Caseinmenge. Die anwesende Wassermenge ist dagegen ohne Einfluss auf im Ganzen ausgelöste Menge Enzym.

Die Enzymlösungen waren in Hedins Versuchen aus Pankreasdrüse durch Selbstverdauung und Filtrieren erhaltene Lösungen. Hervorgehoben muss also werden, dass die relativ schlechte Elutionsausbeute wie auch gewisse andere Phänomene auf verschiedener Sorption und Elution von Tryptase und Kinase beruhen können. Immerhin machen die Versuche,

[1] Dastre, Arch. de Phys. 1896, 120.
[2] Robertson, Jl Biol. Chem. 2, 342. — Marston, Transact. Roy. Soc. South Australia, XLVII, 400; 1923.
[3] Herzfeld und Klinger, Bioch. Zs 88, 232 u. zw. 264; 1918.
[4] Tsou-Hia-Hsü, Bioch. Zs 144, 303; 1924.
[5] Hedin, Bioch. Jl I, 484; 1906. — Erg. d. Physiol. 9, 433; 1910.
[6] Hedin, Bioch. Jl 2, 81; 1906.

wie Hedin hervorhebt, die Bindung des Trypsins an die Substrate wahrscheinlich. Die Versuche über die hemmende Wirkung des Serums („Antitrypsin“) werden wir weiter unten besprechen.

2. Reinigung der Tryptase durch Sorptionsmethoden.

a) Trennung von Lipase.

Die Pankreaslipase ist sehr leicht sorbierbar. Ihre sauren Eigenschaften sind bedeutend stärker als die der Pankreasamylase und die des Trypsins. Deswegen wird die Lipase von Tonerde leicht aufgenommen, während die Hauptmengen der Amylase und Tryptase in der Lösung bleiben[1]. Sowohl Wasser- wie Glycerinextrakte können verarbeitet werden. Als wirksamstes Sorbens erwies sich das Aluminiumhydroxyd B. (Durch Fällung von starker Lösung von Aluminiumsulfat in der Hitze mit etwa 15% NH_3 ohne darauffolgendes Kochen hergestellt.)

Beispiel:

20 ccm Glycerinauszug aus Trockenpankreas wurde mit 1,2 ccm n Essigsäure angesäuert und mit

a) 10 ccm
b) 20 ccm Tonerdesuspension versetzt. Nach Zentrifugieren wurde die Lipase in der Restlösung bestimmt:

a) 0,1095 g Al_2O_3 adsorbierten 54% der Lipase
b) 0,2190 „ „ „ 94% „ „ .

In einem anderen Versuch wurde nach der Tonerdesorption in der Restlösung gefunden:

10% der Lipase
76% der Amylase
Beinahe alles Trypsin.

Die letzten Anteile der Lipase werden durch eine zweite Tonerdesorption entfernt. Dabei gehen nur sehr unbedeutende Mengen Amylase und Trypsin verloren, obgleich für die vollständige Sorption der Lipase verhältnismässig viel Tonerde erforderlich ist. Präparativ wichtig ist weiter, dass bei Verdünnen der Glycerinauszüge mit Wasser ein grosser Niederschlag auftritt, der viel Lipase aber nur wenig Amylase und Trypsin enthält.

b) Trennung von Pankreasamylase.

Die ersten Versuche verdanken wir Danilewsky[2]. Er konnte aus einem lipasefreien künstlichen Pankreassaft durch Sorption an Kollodium das Trypsin frei von Amylase darstellen. Die besten Methoden sind auch hier von Willstätter und Waldschmidt-Leitz ausgearbeitet worden[3]. Da in den durch Tonerdesorption von Lipase befreiten Lösungen die Amylase und die Tryptase ein sehr ähnliches Verhalten bei weiteren Zusätzen von

[1] Willstätter und Waldschmidt-Leitz, H. 125, 132; 1923.
[2] Danilewsky, Virchow Arch. pathol. Anat. u. Physiol. 25, 279; 1862.
[3] Willstätter, Waldschmidt-Leitz und Hesse, H. 126, 143; 1923.

Tonerde zeigten, wurde die Trennung mit Kaolin versucht. Hier wurde gefunden, dass zwei Kaolinadsorptionen nacheinander für die Trennung notwendig waren. Bei der ersten Sorption bedingen einige Begleitstoffe (die Co-Adsorbentien) eine recht geringe Sorption der Amylase und auch eine bei weitem nicht vollständige der Tryptase. Bei der zweiten dagegen wird, da die Coadsorbentien jetzt beseitigt sind, die Amylase nicht mehr gebunden; die Sorption der Tryptase dagegen wird leicht und vollständig durchgeführt.

Beispiel:

200 ccm einer lipasefreien Lösung wurden mit 2,3 ccm n Essigsäure angesäuert und mit 4,8 g elektroosmotisch gereinigtem Kaolin versetzt. Dabei wurden sorbiert

32% der Amylase
etwa 80% der Tryptase.

200 ccm derselben lipasefreien Lösung wurden nun zweimal mit je 4,8 g Kaolin sorbiert. In der Restlösung fand man etwa 75% der noch übrigen Amylase, aber keine Tryptase. Aus den Kaolinadsorbaten liess sich die Tryptase mit einer 0,6%igen Lösung von 2/3 basischem Ammonphosphat eluiren. Die Elution war amylasefrei.

c) Trennung von Erepsin (Peptidase).

Gewissermassen haben schon Schäffer und Terroine eine Trennung dieser Enzyme erzielt[1]. Sie fanden nämlich, dass nach dreitägiger Dialyse frischen Pankreassaftes gegen destilliertes Wasser keine Wirkung gegenüber Eieralbumin wahrzunehmen ist, und dass die Wirkung gegenüber Peptonen usw., die dem Erepsin zugeschrieben wurde, nun durch Enterokinase keine Steigerung mehr erfährt. Abgesehen davon, dass diese „Trennung" eigentlich nur eine Zerstörung der Tryptase sein sollte, so sind die Bestimmungsmethoden so wenig günstig, dass den Versuchen nach dem heutigen Stand unserer Kenntnisse kaum eine Beweiskraft zuerkannt werden kann. Die Trennung unter Erhaltung der Wirksamkeit beider Enzyme ist von Waldschmidt-Leitz durchgeführt; sie beruht auf der verschiedenen Sorbierbarkeit der Enzyme durch Tonerde bei pH = etwa 5.

Von der Sorbierbarkeit der Enzyme bei verschiedenen Aciditäten gibt folgende Tabelle ein Beispiel. 3,5 ccm Glycerinauszug aus getrockneter Drüse + 3,5 ccm Wasser + 1 ccm Tonerdesuspension (10,4 mg Al_2O_3) + Puffer (etwa 0,5 ccm)

pH bei der Sorption	% Tryptase sorb.	% Erepsin sorb.
7,0	52	28
5,6	0	50
4,7	0	55
3,8	0	53
1/100 Essigs.	13	55

[1] Schäffer und Terroine, Jl de Physiol. et Pathol. gen. 12, 905; 1910.

Durch eine dreimal vorgenommene Tonerdesorption gelang die vollständige Entfernung des Erepsins, während der grösste Teil der Tryptase in der Mutterlauge blieb. Die Elution des Erepsins erfolgte mit einer alkalischen glycerinhaltigen Phosphatlösung.

d) Trennung von der Enterokinase.

Waldschmidt-Leitz hat als endgültigen Beweis für die Aktivatornatur der Enterokinase ihre Trennung von der Tryptase durchführen können. Durch Sorption mit Tonerde aus saurer Lösung gelang es nicht nur einer spontan teilweise aktivierten Tryptase ihre Enterokinase zu nehmen, sondern sogar maximal durch Zusetzen von überschüssiger Enterokinase aktivierte Tryptase in aktivierbare Form überzuführen[1]. Beispiel:

1,25 g Trockenpankreas in 40 ccm Wasser wurde mit 1,0 ccm Kinaselösung 40 Minuten bei 30° gehalten. Die Tryptase war dann maximal aktiviert. 22 ccm des Extraktes wurden mit 0,3 ccm n Essigsäure und 10 ccm Tonerdesuspension (0,150 g Al_2O_3) behandelt: 3,0 ccm der Restlösung hatte folgende Tryptasewirkung:

ohne Enterokinase 0,25 ccm KOH Aciditätszuwachs
mit 0,05 ccm „ 0,55 „ „ „ .

Von der Elution des Sorbates mit 20 ccm Ammonphosphatlösung bewirkten 2,0 ccm a) ohne Zusatz von Aktivator, b) nach ½ stündiger Einwirkung auf 0,062 g Trockenpankreas eine Aciditätszunahme entsprechend:

a) 0,38 ccm KOH b) 0,92 ccm KOH

während die angewandte Menge Trockenpankreas für sich allein nur einen Zuwachs an Acidität von 0,09 ccm KOH ergab.

Die Enterokinase wird also unter den gegebenen Bedingungen stark sorbiert, die Tryptase nur wenig. Aus dem Sorbat kann die Enterokinase in aktiver Form eluiert werden.

Der Effekt der Flaviansäure-Fällung nach Cas. Funk (Zelle u. Gew. 13, 46; 1926) lässt sich erst nach Mitteilung quantitativer Wirksamkeitsangaben beurteilen.

C. Aktivierung der Tryptase.

Kühne[2] fand, dass in gewissen Fällen Pankreasinfus eine sehr schlechte Trypsinwirkung zeigt, die indessen durch Erwärmen und schwaches Ansäuern beträchtlich zunahm. Heidenhain[3] wies später nach, dass dies allgemein in jedem Pankreasextrakt eintritt. Die Annahme von Kühne, dass die Säure aus einer unwirksamen Substanz das Trypsin abspalte, wurde von Heidenhain dahin modifiziert, dass die Säure die Verbindung des Trypsins mit dem Eiweiss der Drüse aufhebt. Der als Spontanaktivierung der Tryptase bezeichnete Vorgang, wo ein inaktives Drüsenmaterial durch Lagern aktiv wird, blieb lange unerklärt. Man nahm eine Wirkung der bei der Autolyse auftretenden Säure oder eine Wirkung von Kalksalzen oder von aktivatorhaltigen Bakterien an.

---

[1] Waldschmidt-Leitz, H. 132, 181; 1923/24 u. zw. S. 235.
[2] Kühne, Arch. Anat. Phys. 39, 130; 1867.
[3] Heidenhain, Pflüg. Arch. 10, 557; 1875.

Die Entdeckung, dass die Aktivierung durch einen spezifischen Körper hervorgerufen wird, wurde von Pawlow und Schepowalnikow gemacht[1]. Sie fanden, dass die Schleimhaut des Dünndarms einen Extrakt lieferte, der das inaktive Trypsin, das Trypsinogen, stark aktivierte. Haben Extrakte aus frischem Pankreas und noch sicherer Pankreasfistelsäfte keine Wirkung auf wahre Proteine, was aus einer Menge von zuverlässigen Arbeiten hervorgeht[2], so spalten sie nach Einwirkung von einem in dem Darmsaft befindlichen Stoff dieselben Proteine schnell. Der Aktivator wurde von Pawlow Enterokinase genannt. Neue Untersuchungen haben ergeben, dass die Aktivierung des Trypsins ausschliesslich durch Enterokinase geschieht und dass also auch die sog. Spontanaktivierung auf der Entstehung von Enterokinase in der Drüse beruht.

Wirkungsweise der Enterokinase (Co-Tryptase)[3].

Über die Art der Wirkung der Enterokinase auf das Trypsin standen sich bis vor kurzem zwei prinzipiell verschiedene Auffassungen gegenüber. Die erste, die von Pawlow und Schepowalnikow zur Deutung der Verhältnisse herangezogen wurde, sagt, dass die Enterokinasewirkung eine Enzymwirkung ist, durch die aus dem Trypsinogen ein neuer Stoff, das Trypsin, gebildet wird. Bei der Proteolyse sollte die Enterokinase also keine Rolle spielen. Vertreten wurde diese Annahme besonders durch Arbeiten von Bayliss und Starling[4]. Sie behaupten, dass eine geringe Spur Enterokinase bei genügender Einwirkungsdauer sehr grosse Mengen von Trypsinogen in Trypsin verwandeln kann. Mellanby und Woolley fanden[5], dass Temperaturerhöhung die Geschwindigkeit der Kinasewirkung erhöht, und kommen auch zum Schluss, dass die Wirkung enzymatischer Natur ist.

Die zweite Theorie über die Wirkung der Enterokinase stammt von Hamburger und Hekma[6]. Sie fanden in ihren Versuchen, dass eine bestimmte Menge Kinase nur eine begrenzte Menge Trypsinogen aktivieren kann, und schlossen, dass eine Verbindung von Trypsinogen und Kinase die wirksame Molekülart ist. Zu demselben Resultate kamen Dastre und Stassano[7]. Delezenne[8] nahm zur Erklärung der Notwendigkeit der Kinase für die Trypsinwirkung an, dass die Kinase die Bindung Enzym-Substrat vermittelt. Dieser Schluss ist natürlich nicht notwendig und im Lichte neuerer Forschungen nicht einmal wahrscheinlich. Die Versuche von

[1] Schepowalnikow: Malys Jahresber. 29, 378; 1899.
[2] Delezenne et Frouin: Soc. Biol. 54, 691. — C. r. 134, 1526; 1902. — Glaessner H. 40, 465. — Welsch: Arch. Internat. Phys. 7, 247; 1909.
[3] Vgl. hiezu I. Teil (3. Aufl.), S. 219 u. ff.
[4] Bayliss und Starling, Jl of Phys. 30, 61; 1904.
[5] Mellanby und Woolley, Jl of Phys. 45, 370; 1912/1913.
[6] Hamburger und Hekma, Jl de Physiol. et Pathol. gén. 4, 805; 1902.
[7] Dastre und Stassano, Arch. Internat. de Physiol. 1, 86; 1904.
[8] Delezenne, C. R. Soc. Biol. 55, 171; 1903.

Hamburger und Hekma waren etwas dürftig und wurden als nicht beweiskräftig angesehen. Erst die moderne Methodik ermöglichte die Entscheidung, und zwar wurde durch die Untersuchungen von Willstätter und Waldschmidt-Leitz gezeigt, dass die Auffassung von Hamburger und Hekma die richtige ist: Trypsinogen und Kinase verbinden sich stöchiometrisch zu dem aktiven Enzym[1].

Wirkungsbereich der Tryptase.

Die schon lange bekannte Tatsache, dass bei der Verdauung der Eiweissstoffe durch natürliches Trypsin die Spaltung sehr weit geht, führte entweder zu der Annahme, dass eine Protease und eine Peptidase dabei wirksam seien[2], oder zu der, dass das Trypsin + Enterokinase die Proteine angreifen und die Spaltung bis zu den Aminosäuren treiben kann. In den letzten Stufen dieser komplizierten Reaktion sollte dann die Enterokinase entbehrlich sein.

Waldschmidt-Leitz, der sich in seinen ersten Arbeiten der letztgenannten Auffassung[1] anschloss, konnte indessen dann zeigen, dass die gewonnenen Resultate besser mit der Annahme zu vereinbaren sind, dass das Trypsin + Enterokinase die Proteine in Peptide spaltet und dass diese dann durch eine Peptidase weiter in die Aminosäuren zerlegt werden. Seine Untersuchungen gipfeln in dem Nachweis, dass sich Tryptase und Peptidase durch Sorptionsmethoden trennen lassen[3]. Die Isolierung der einzelnen Enzyme ermöglichte nun die Prüfung der Spezifität derselben und veranlasste genauere Untersuchungen über die Bedeutung der Enterokinase, Untersuchungen, die von Waldschmidt-Leitz ausgeführt wurden und sehr wertvolle Resultate erbracht haben.

Zuerst zeigte sich, dass das Pankreaserepsin alle untersuchten Dipeptide spaltete, dagegen wurden höhere Spaltprodukte (Pepton der Pepsinverdauung) nicht angegriffen, ebensowenig Protamine, Histone, Casein und andere Eiweissstoffe.

Die Tryptase, die nach der Abtrennung des Pankreaserepsins in inaktiver Form gewonnen wird und auch nicht mehr eine Selbstaktivierung erleidet, konnte nun ebenfalls näher untersucht werden. Es wurde nun die sehr interessante Entdeckung gemacht, dass die Tryptase in ihrer z. B. gegen Gelatine inaktiven Form noch gegen gewisse Substrate Aktivität besitzt, und zwar konnte gezeigt werden, dass dies nicht etwa auf Spuren von Kinase beruht. Wir führen nach Waldschmidt-Leitz[4] folgende Tabelle an:

[1] Waldschmidt-Leitz, H. 132, 181; 1923/24.

[2] Siehe z. B. Schaeffer und Terroine. Jl de Physiol. et Pathol. gén. 12, 884 und 905; 1910.

[3] Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 149, 203; 1925.

[4] Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 149, 214; 1925.

Substrat	Enzym		
	Erepsin	Trypsin	Trypsin + Kinase
Alle untersuchten Dipeptide	+	—	—
Leucyl-glycyl-glycin	+	—	—
Pepton ex Albumine (Merck) . . .	—	+	++
Clupein	—	+	++
Thymushiston	—	+	++
Casein	—	—	+
Fibrin	—	—	+
Gelatine	—	—	+
Gliadin	—	—	+
Zein	—	—	+

Aus den Untersuchungen über das Verhalten des enzymatisch einheitlichen Trypsins geht nun weiter hervor, dass dessen Wirkung mehr als eine rein „desaggregierende" ist, wie wir auch später im Falle von der Pepsinverdauung sehen werden. Carboxyl- und Aminogruppen werden freigemacht, und nicht unbeträchtliche Mengen freier Aminosäuren entstehen, deren Ursprung noch nicht klar ist.

D. Wirksamkeit und Reinheitsgrad.

Wie schon oben erwähnt wurde, ist die Tryptase an sich unwirksam. Dies gilt wenigstens für die Spaltung der meisten und gewöhnlichsten der Substrate, z. B. der Gelatine, die von Willstätter und Mitarbeitern bei ihren Versuchen angewandt wurde. In Verbindung mit der Enterokinase (Co-Tryptase) ist sie wirksam. Wie später im Zusammenhang mit unseren übrigen Kenntnissen über die Enterokinase berichtet werden soll, fordert die Aktivierung der Tryptase durch diesen Stoff eine gewisse Zeit. Es fordert also die Bestimmung der Tryptase, sofern es auf eine Messung ihrer Menge ankommt, dass die Aktivierung maximal ist oder wenigstens eine bekannte Grösse hat. Dies ist natürlich bei allen Arbeiten über Vorkommen und Reinigung des Enzyms zu beachten.

Bei der Reinigungsarbeit ist nun weiter von Bedeutung, dass das schon aktivierte Enzym z. B. durch Sorptionsmittel wieder in unwirksames Enzym und Aktivator zerlegt werden kann. Die Reinigungsarbeit an Enzym und Aktivator kann also getrennt fortgeführt werden.

Die oben besprochenen Umstände sind, soweit möglich, in den neuen, in Willstätters Laboratorium ausgeführten Arbeiten über Tryptase berücksichtigt[1]: Durch Einwirkung von überschüssiger Kinaselösung wird jede Trypsinprobe maximal aktiviert. Die stark hemmende Wirkung der Reaktionsprodukte wird durch eine sehr kurze Versuchsdauer möglichst ausgeschaltet.

[1] Siehe z. B. Willstätter und Persiel, Trypsinbestimmung, H. 142, 245; 1924/25.

Die wenigstens in rohen Tryptaselösungen, ähnlich wie in Pepsinlösungen, vorkommenden Hemmungskörper bewirken eine verhältnismässig kleinere Wirkung von grossen Enzymmengen, und deren Wirkung wird dadurch auf ein Minimum reduziert, dass teils nur kleine Enzymmengen zur Anwendung kommen, teils die Substratkonzentration recht hoch gewählt wird. Dadurch wird die Bildung der Verbindung Enzym-Substrat auf Kosten der Verbindung Enzym-Hemmungskörper begünstigt.

Etwa 10 mg Drüsenpulver oder eine entsprechende Enzymmenge wird während 30 Minuten der Wirkung von 0,3 ccm Kinaselösung bei 37° ausgesetzt (Kinaselösung = Auszug $^1/_{50}$ aus trockener Dünndarmschleimhaut). Danach wird mit Wasser auf 5,0 ccm aufgefüllt (37°). Dazu kommt eine auf 37° vorgewärmte Mischung von 2,0 ccm Puffer (n-NH_3 — NH_4Cl 1 : 2) und 5,0 ccm 15%ige Gelatinelösung. Nach einer Verdauungszeit von 20 Minuten bei 37° wird die Aciditätszunahme durch Titrieren in alkoholischer Lösung nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz bestimmt.

Folgende Tabelle zeigt, inwieweit die Reaktionsgeschwindigkeit, d. h. die Aciditätszunahme, nach 20 Minuten der Enymmenge proportional ist.

f = 0,25	0,50	0,50	1,00	1,00	2,00	3,00	4,00	ccm Enzymlösung
x = 0,33	0,58	0,58	1,19	1,15	2,04	2,67	2,91	ccm 0,2 n KOH
x/f = 1,3	1,2	1,2	1,2	1,15	1,0	(0,9)	(0,7)	

Die Enzymlösung war hier frisch hergestellt. Folgende Tabelle gilt für einen gealterten Pankreasauszug, wo also mehr Hemmungskörper vorhanden sind.

f = 0,50	1,00	2,00	4,00	ccm Enzymlösung
x = (0,27)	0,40	0,73	1,35	ccm 0,2 n KOH
x/f = (0,54)	0,40	0,37	0,34	

Die Kurve (Fig. 51), welche den Umsatz x als Funktion der Enzymmenge f darstellt, ist anfangs eine Gerade. Bei zu kleinen Enzymmengen (= Umsätzen) sind die Titrationsfehler relativ grösser, und für die Bestimmung der Tryptasemenge wird der in der Figur dick ausgezogene Teil der Kurve verwendet. (Die Figur muss in der Originalarbeit verkehrt gedruckt sein.)

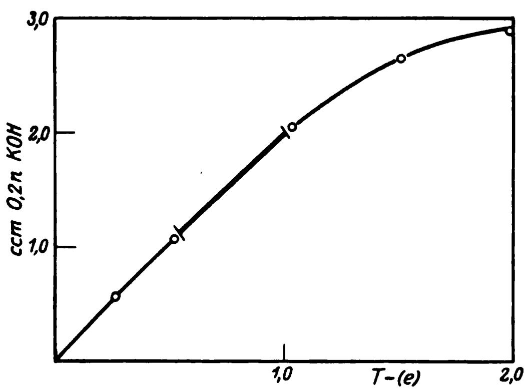


Fig. 51.

Als vorläufige Einheit der Tryptasemenge T-(e) bezeichnen die Verfasser die tryptische Leistung, die unter folgenden Bedingungen einen Aciditätszuwachs von 2,00 ccm 0,200 n KOH erzeugt:

Vorbehandlung der Enzymlösung mit 0,3 ccm Enterokinase-Auszug 1/50 aus trockener Dünndarmschleimhaut.

Substrat: 0,75 g Gelatine.

Totalvolumen: 12,0 ccm, enthaltend 2,0 ccm Ammoniak-Salmiakmischung; 20 Min. bei 37°.

Eine T-(e) ist enthalten ungefähr in 10 mg Pankreaspulver oder in 0,2 ccm Glycerinauszug 1:16 oder 2,0 ccm Wasserauszug 1:100.

Zum Abbrechen der Reaktion wird in heissen absoluten Alkohol eingegossen und mit absolutem Alkohol nachgespült. Totalvolumen des Alkohols 110 ccm, zuvor mit einigen Tropfen KOH gegen Tymolphthalein (0,5 ccm 0,5%ige Lösung) neutralisiert. Man titriert nun schnell mit KOH zum schwach graublauen Farbtone. Der Leerverbrauch an KOH der ungespaltenen Lösung wird abgezogen. Bei Eingiessen des Reaktionsgemisches in den Alkohol muss man darauf achten, dass keine Gelatineklumpen entstehen.

Beispiel:	2,00	5,00	10,00 mg Pankreaspräparat
	0,54	1,14	2,20 ccm 0,2 n KOH
	0,24	0,52	1,14 T-(e) aus der Kurve
	0,23	0,57	1,14 T-(e) berechnet.
	0,10	0,20	0,40 ccm Glycerinauszug
	1,14	2,15	2,52 ccm KOH
	0,52	1,10	1,38 T-(e) aus der Kurve
	0,55	1,10	2,20 T-(e) berechnet.

Einfluss des Dispersitätsgrades des Substrats.

Obgleich niemand bezweifeln dürfte, dass zwischen den Spaltungsgeschwindigkeiten eines festen Substrates und seiner Lösung Unterschiede bestehen, so muss man gestehen, dass auch hier der physikalische Zustand des Substrates eine sehr untergeordnete Rolle spielt. Zu erwähnen sind zuerst einige Versuche von Northrop[1], wo die Spaltung von Gelatinelösungen verschiedener Viscosität untersucht wurde. Eine 2%ige Gelatinelösung wurde bei 50° bereitet und auf 25° abgekühlt. Beim Aufbewahren bei dieser Temperatur steigt die Viscosität langsam. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben ausgenommen und die Viscosität und Trypsinspaltung untersucht (Leitfähigkeitsmessung und Formoltitration).

Viscosität ($H_2O = 1$)		Zeit zum Erreichen eines best. Umsatzes $St \times 10^2$	Formoltitration ccm n/50 Lauge
Versuchsbeginn	Nach der Verdauung		
2.45	1,4	70	2,90
2,90		68	2,90
3,8	1,55	70	2,90
3,9	1,5	69	2,95
4,6	1,6	64	2,95
		76	2,97
7,8	1,7	80	2,95
		80	2,90
11,3	1,8	62	—
		70	2,95

[1] Northrop, Jl of. gen. Physiol 6, 337; 1924.

Eine Änderung der Viscosität von 2,45 auf 11,7 hat also auf die Spaltungsgeschwindigkeit durch Trypsin keinen Einfluss.

In Zusammenhang mit den öfters angeführten Theorien über die Bedeutung der Lauge (bzw. der Säure im Falle von Pepsin) für die Quellung

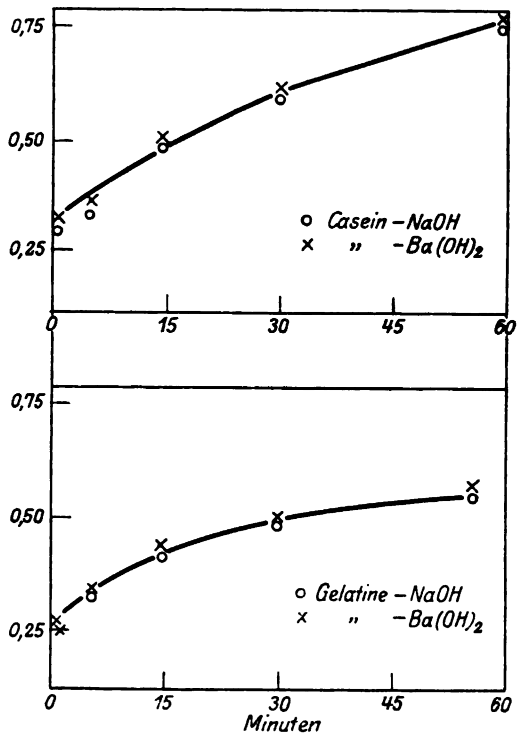


Fig. 52.

der Proteine, wodurch erst die Spaltung ermöglicht werden sollte, sind auch einige Versuche von Northrop erwähnenswert[1]. Er untersuchte die Spaltung einiger Eiweisse unter Anwendung von NaOH und $Ba(OH)_2$. Der physikalische Zustand des Substrats ist in diesen Fällen ganz verschieden. Figur 52 gibt über die Resultate Aufschluss.

Die Spaltungsgeschwindigkeit ist identisch in beiden Fällen.

E. Kinetik.

1. Einfluss der Enzymmenge.

Dass wenigstens bei kleinen Enzymmengen und im Anfang der Spaltung eine direkte Proportionalität zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit herrscht, ist eine alte Erfahrung. Der Arbeit von Bayliss über die Kinetik der Trypsinspaltung entnehmen wir folgende Tabelle. Die T-Werte bedeuten Zeiten gleichen Umsatzes.

[1] Northrop, Jl of. gen. Physiol 6, 487; 1922.

Enzymmenge E.	T	TE	T	TE	T	TE	T	TE
4	4,5	18	13	52	54	216	266	1064
2,5	7,5	18,8	19	47,5	58	145	245	615
2	10	20	24	48	79	158	274	548
1	19	19	45	45	126	126	480	480
0,5	37	18,5	89	44,5	233	116	720	360

In Übereinstimmung mit dem Befund von Bayliss stehen Versuche von Hedin u. a., ebenso die schon früher zitierte Untersuchung von Willstätter und Persiel[1]. Aus allen diesen Untersuchungen ist zu sehen, dass die Bestimmung der Tryptasemenge mit kleinen Enzymmengen ausgeführt werden muss. Dass bei grösseren Enzymmengen Proportionalität zwischen Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit nicht statthat, muss auch hier auf den in der unreinen Enzymlösung vorkommenden Hemmungskörpern beruhen. Diese stammen sicherlich aus den durch die Tryptase spaltbaren Eiweissstoffen, und die Erscheinung ist also in ihrem Wesen nur eine Hemmung durch die Reaktionsprodukte der enzymatischen Tätigkeit, wie sie wohl bei allen Enzymreaktionen vorkommt.

2. Hemmung durch die Reaktionsprodukte.

Nimmt man die moderne Anschauung über die Verbindung Enzym-Substrat an, und sieht man in dem Enzym einen Katalysator, der die Geschwindigkeit einer umkehrbaren Reaktion in beiden Richtungen vergrössert, so folgt daraus, dass das Enzym zu den primären Reaktionsprodukten eine Affinität haben muss. (Sekundäre spontan verlaufende Umwandlungen dieser Stoffe können natürlich Stoffe entstehen lassen, zu welchen das Enzym keine Affinität hat.) Besonders gut wird der Zusammenhang zwischen den Affinitäten des Enzyms zu Substrat und zu Reaktionsprodukten erklärt, wenn man annimmt, dass dieselben Affinitätsstellen wirksam sind, und dass also die Affinität des Enzyms zum Substrat durch zwei Bindungen vermittelt wird[2]. Eingehendere Versuche mit den nach den Sorptionsmethoden gewonnenen einheitlichen Enzymlösungen sind noch nicht ausgeführt worden und eine Prüfung der „Zweiaffinitätstheorie“ an der Tryptase ist deshalb noch nicht möglich.

Dass die Spaltungskurve der tryptischen Verdauung von der logarithmischen Kurve abweicht, und dass diese Abweichung der hemmenden Wirkung gewisser Reaktionsprodukte zuzuschreiben ist, hat schon Bayliss klar ausgesprochen[3].

[1] Willstätter und Persiel, H. 142, 245; 1924/25.
[2] Euler, Sv. Vet. Akad. Archiv f. Kemi, 9, Nr. 13; 1924.
[3] Bayliss, Arch. des sciences biol. St. Petersburg 1904.

Nach Bayliss sollen auch gewisse Aminosäuren hemmen, was indessen durch neuere Untersuchungen nicht bestätigt wird.

Zu 6 ccm Caseinogen-Trypsingemisch (4% Caseinogen) wurden 4 ccm der 5%igen Lösung der zu untersuchenden Körper gegeben. Die Änderung der Leitfähigkeit in einer Stunde wurde gemessen.

Zugesetzter Stoff	Rel. Änderung der Leitfähigk.
Rohrzucker (Kontrolle)	100
Albumosen von Trypsinverdauung, durch $(NH_4)_2SO_4$ gefällt	52,5
Biuretgebende Produkte von einer Caseinogenverdauung	53,2
Abiurete Produkte von derselben	44,4
Deuteroalbumose (Grübler)	87
Amphopepton (Grübler)	67
Leucin (Merck)	38,6
Glykokoll (Merck)	29,3

In einer zweiten Versuchsreihe untersuchte Bayliss die Einwirkung verschiedener Substratkonzentrationen auf die Hemmung. Die Versuche seien in folgender Tabelle zusammengefasst:

Zu den Versuchen mit Hemmung wurden 5 ccm einer 5%igen Lösung von Verdauungsprodukten gesetzt. Alle Versuche in demselben Volumen ausgeführt: Zeit 2,5 Stunden.

ccm 5% Caseinlösung	Rel. Änderung der Leitf.		% Hemmung
	ohne Hemmung	mit Hemmung	
4	100	36,2	63,8
2	69	27,7	60,0
1	39	15,6	60,1

Nach diesem Versuche wäre die Hemmung der Reaktionsprodukte von der Substratkonzentration unabhängig. Nun sind diese Versuche zwar ohne Rücksicht auf pH-Verschiebungen und ohne Messung des pH angestellt; sie sind aber in neuerer Zeit von Northrop wiederholt worden und zwar mit demselben Ergebnis[1]. Dies führt Northrop zu der Annahme, dass nie grössere Mengen der Tryptase an das Substrat gebunden sind. Die weitere Annahme von Northrop, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Trypsinspaltung mehr von der Bildungsgeschwindigkeit einer Enzym-Gelatineverbindung abhängt, bringt möglicherweise einige Klarheit; weitere Versuche müssen die Entscheidung bringen. Hier sei jedoch angeführt, dass sowohl die Spaltprodukte, als das Substrat gegen Hitzezersetzung des Enzymes schützen, und dass dadurch eine Bindung des Enzymes an das Substrat wahrscheinlich ist. Auch kommt Bayliss zum Schluss, dass die Enzymwirkung am besten unter der Annahme einer Enzym-Substratverbindung zu verstehen ist[2].

Wie wir unten sehen werden, beruhen die Ergebnisse, die gegen die gewöhnliche Auffassung von Enzym-Substratverbindungen usw. zu sprechen

[1] Northrop, Jl of. gen. Physiol. IV, 245; 1922.
[2] Bayliss, Arch. d. sc. Biol. XI. suppl. 261; 1904.

scheinen, wahrscheinlich darauf, dass die angewandten Bestimmungsmethoden untereinander nicht vergleichbar sind. Bestimmt man das unveränderte Substrat, so erhält man ganz andere Gesetzmässigkeiten, als wenn man z. B. die freigemachten Aminogruppen nach irgendeiner Methode ermittelt.

In seiner Arbeit über die Hemmung der Trypsinwirkung durch die Reaktionsprodukte teilt Northrop[1] auch einige andere bemerkenswerte Resultate mit: Er findet, dass die prozentische Hemmung in dem Aciditätsgebiete pH 6,3—10 von der Acidität unabhängig ist. Dies kann etwas eigentümlich erscheinen, da die hemmenden Reaktionsprodukte wohl als Peptide aufzufassen sind, und man hätte erwarten können, dass auch ihre Bindung an dem Enzym von der Acidität abhängen, ähnlich wie es Northrop selbst für die verschiedene Substrate gefunden hat.

Die Hemmungskörper konnte Northrop weder durch Hydrolyse von Eiweiss mit Säure noch durch Hydrolyse mit Lauge erhalten. Sie sind dialysierbar.

Glykokoll, Alanin, Tryptophan, Leucin, Tyrosin, Arginin, Prolin, Histidin hemmen nicht, wenn pH-Verschiebungen nicht eintreten. Das Gleichgewicht Enzym-Hemmungskörper stellt sich momentan ein.

Dass nach zuverlässigen Versuchen die Hemmung wenigstens durch gewisse Hemmungskörper von der Substratkonzentration unabhängig ist, kann so gedeutet werden, dass Substrat und Hemmungskörper verschiedene „Affini tätsstellen" des Enzymmoleküls angreifen.

Die Fragen über Hemmungen und über Verbindung Enzym-Substrat usw. sind natürlich wie in allen älteren Arbeiten von der Nichteinheitlichkeit des Enzymmaterials beeinflusst worden. Auch hier spielt die Bestimmungsmethode eine grosse Rolle.

Die wichtigsten Versuche Northrops, die gegen die Annahme einer Enzym-Substratverbindung sprechen konnten, sind die Versuche über die Verdauung eines Gemisches von Casein und Gelatine[2]. Versuche über den Einfluss der Gelatinekonzentration auf die Verdauungsgeschwindigkeit ergaben, dass die Verdauungsgeschwindigkeit bei Konzentrationen höher als 2 % konstant ist. Dies wäre so zu deuten, dass hier alles Trypsin an Gelatine gebunden ist. Es wurden nun zwei Parallelversuche ausgeführt. Substrat war in dem einen Versuche 2,5 % Casein, in dem zweiten 2,5 % Casein + 3 % Gelatine. Die Verdauung des Caseins wurde durch Bestimmung des in Trichloressigsäure unlöslichen Restes gemessen (Gelatine ist darin löslich). Figur 53 zeigt das Resultat.

Die Versuche zeigen also, dass die Verdauung des Caseins von der Anwesenheit der Gelatine kaum abhängig ist, was nach Northrop damit nicht in Einklang sein kann, dass alles Trypsin bei der angewandten Gelatinemenge daran gebunden sein sollte. Wie wir unten sehen werden, beruhen diese

[1] Northrop, Jl of gen. Physiol. IV, 245; 1922.
[2] Northrop, Jl of gen. Physiol. VI, 239; 1924.

Resultate darauf, dass die angewandten Bestimmungsmethoden nur eine Reaktionsstufe betreffen, und, da die Resultate unberechtigt als Mass der ganzen Reaktion benutzt werden, zu einer fehlerhaften Auffassung geführt haben. Nun

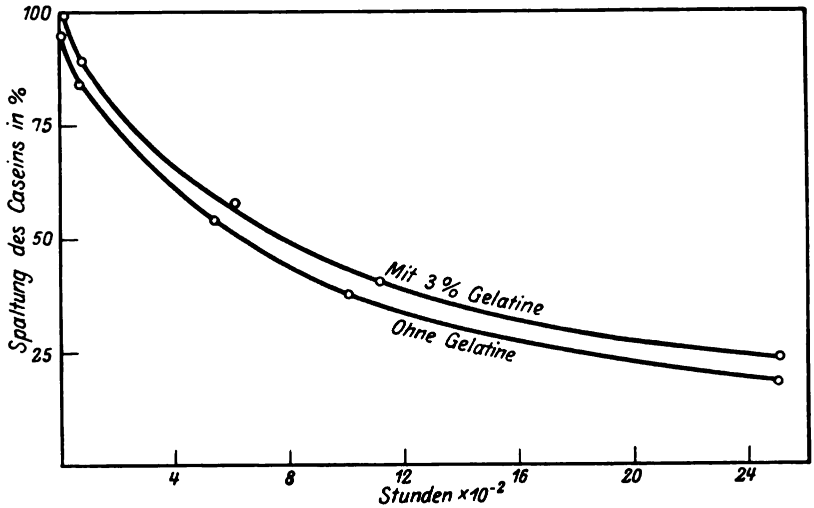


Fig. 58.

ist auch a priori nicht sicher, dass die Bindung an die beiden Substrate durch dieselbe Gruppen des Enzyms vermittelt wird. Eine Annahme, dass die Substrate unabhängig von einander gebunden werden, erklärt die obigen Versuche, macht aber das Problem der proteolytischen Enzyme noch komplizierter. Ähnliche Versuche haben schon früher Henri und Larguier des Bancels ausgeführt.

3. Zeitlicher Verlauf der Tryptasespaltung.

Der zeitliche Verlauf wird durch die Hemmung der Reaktionsprodukte bedingt. Da diese nicht einmal bekannt sind, noch weniger ihre Wirkung klar ist, kann zur Zeit keine theoretische Behandlung des Reaktionsverlaufes vorgenommen werden. So viel scheint doch aus den vorliegenden Versuchen hervorzugehen, dass die Hemmung nach der allgemeinen Gleichung

$$\frac{[\text{Enzym}] \times [\text{hemmender Stoff}]}{[\text{Verb. Enzym-Hemmungsstoff}]} = K$$

berechenbar ist.

Hier sei eine Versuchsreihe von Northrop angeführt: 2% Gelatinelösung mit verschiedenen Mengen einer eingeengten Lösung von tryptischen Verdauungsprodukten.

ccm hemmender Lösung	Reaktions-geschwindigkeit	ccm hemmender Lösung	Reaktions-geschwindigkeit
—	2,3	0,50	1,10
0,125	1,9	1,0	0,65
0,25	1,56	2,0	0,33

Die in der Fig. 54 gezeichnete Kurve hat die Form einer Dissoziationskurve.

Alte Versuche über den Reaktionsverlauf finden sich in grosser Menge. Im allgemeinen sind sie nur von geringem Wert. Öfters wurden die Versuche angestellt, um die Übereinstimmung mit irgendeiner Formel (der Schützschen Regel u. dgl.) zu finden. Bedenkt man nun, dass ähnliche Formeln ohne die geringste innere Bedeutung sind, so ist leicht zu ersehen, dass die Versuche wenig zur Klarlegung des Reaktionsverlaufes beigetragen haben.

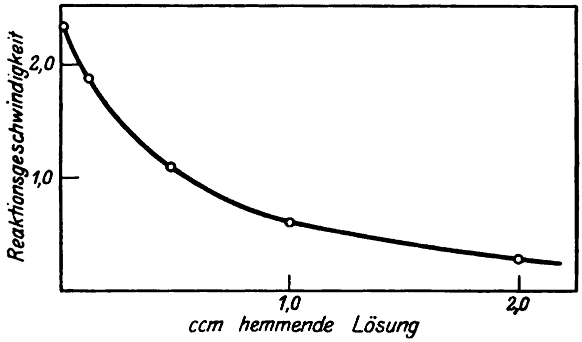


Fig. 54.

Von den ältesten Versuchen sind zu erwähnen die von Henri und Larguier des Bancels[1], die hier die Leitfähigkeitsmessung als Bestimmungsmethode angewendet haben. Sie fanden, dass sich die Anfangsgeschwindigkeit nach der Formel für monomolekulare Reaktion berechnen lässt. Dann werden die Konstanten kleiner. Nach Arrhenius soll sich ein relativ guter Anschluss an die Schützsche Regel bei einer Berechnung der Zahlen von Henri und Larguier des Bancels ergeben[2]. Da indessen keinerlei Anhaltspunkte darüber vorliegen, ob die Acidität konstant gehalten war, können diese Resultate über die Kinetik der Tryptasewirkung wenig aussagen.

Stark fallende Reaktionskonstanten erster Ordnung fand auch Bayliss[3]: 4% Lösung von Casein. Schwach alkalische Reaktion durch verdünntes Ammoniak hergestellt. Messung der Leitfähigkeit. Angenommen wird, dass die Änderung der Leitfähigkeit der Änderung in der Substratkonzentration während der Spaltung proportional ist, was nicht ganz unbedenklich erscheint. Aus einem Versuche wurden nach der Formel

$$k = \frac{1}{t_2 - t_1} \log. \text{nat.} \left(\frac{C_1}{C_2}\right)$$

die Konstanten k berechnet. (C = die zur Zeit t ungespaltete Substratmenge.)

Während der	ersten	10	Minuten	k = 0,0079
„ „	zweiten	10	„	0,0046
„ „	dritten	10	„	0,0032
„ „	vierten	10	„	0,0022
„ „	fünften	10	„	0,0016
„ „	siebenten	10	„	0,0009
„ „	neunten	10	„	0,00065 usw.

Rechnet man die Konstanten nach der gewöhnlichen monomolekularen Formel aus, so erhält man natürlich Werte, die noch stärker abfallen. Arrhenius hat die Werte von Bayliss nach der Formel

[1] Henri und Larguier des Bancels, Soc. Biol. 55, 787 und 866; 1903.

[2] Arrhenius, Immunochemie, Leipzig 1907.

[3] Bayliss, Arch. des sciences biol. St. Petersburg 1904. S. 4 ff.

$$k = \frac{a}{t} \log \frac{a}{x} - \frac{a - x}{t}$$ x = beobachtete Leitfähigkeit, a = Entwert der „

berechnet und eine gute Übereinstimmung gefunden [1].

Auch diese Versuche sind durch die auftretenden Aciditätsänderungen entstellt.

Da die Reaktionen, welche die Hemmung der Trypsinwirkung bedingen, noch nicht genau bekannt sind, so sind natürlich alle Formeln, die der Wirkung von den Hemmungskörpern Rechnung tragen sollen, eigentlich noch recht wertlos, obgleich es nicht bezweifelt werden soll, dass die Hemmungen dem Gesetz der Massenwirkung folgen.

Unter Verhältnissen, bei denen die Wirkung der Hemmungskörper möglichst ausgeschaltet wurde, fand Northrop [2] eine gute Konstanz der nach der monomolekularen Formel berechneten Koeffizienten. Teils wurde bei 0° gearbeitet, um eine Enzymzerstörung zu vermeiden, teils wurde die Menge nicht zersetzten Substrates bestimmt, um den Verlauf der ersten Reaktionsstufe kennenzulernen. In diesem Falle wurde, wie die folgenden Tabellen zeigen, eine gute Übereinstimmung mit der Formel

$$\frac{dx}{dt} = k \cdot (A - x)$$

gefunden.

A = die ursprüngliche Substratkonzentration,
x = die zur Zeit verschwundene Substratmenge.

Zeit in Stunden	Substratmenge 1 % Casein	$k = \frac{1}{t} \log \frac{A}{A - x}$
0,00	(100)	—
0,01	99,5	—
0,11	94,4	0,235
0,215	89,0	0,236
0,53	74,5	0,242
1,0	55,4	0,255
2,51	25,2	0,238
4,00	10,8	0,238

Bei konstanter Substratkonzentration war die Geschwindigkeit der Enzymmenge proportional.

Relative Trypsinmenge	1	2	4	8
Geschwindigkeit k • E	0,057	0,11	0,24	0,50
Korr. Geschwindigkeit k	0,057	0,055	0,060	0,062

Versuche von Northrop [3] bei hoher Temperatur und mit grossen Substratkonzentrationen zeigten dagegen, dass hier die Zerstörung des Enzyms der bestimmende Faktor ist. Da die Substratkonzentration so gross ist, dass sie während der Verdauung als konstant angesehen werden kann, so wird hier die totale Hydrolyse der zugesetzten Enzymmenge proportional, und die

[1] Arrhenius, Immunochemie, Leipzig 1907.
[2] Northrop, Jl of gen. Physiol. 6, 417; 1924.
[3] Northrop, Jl of gen. Physiol. 6, 429; 1924.

Geschwindigkeitskonstante, aus der für jede Enzymmenge erreichten Umsetzung berechnet, wird von der Enzymmenge unabhängig und ist als die Inaktivierungskonstante des Enzyms (oder vielleicht richtiger der Enzymsubstratverbindung) anzusehen.

In neuester Zeit haben Willstätter und Persiel[1] einige Versuche über den zeitlichen Verlauf der Tryptasewirkung veröffentlicht. Sie finden auch, dass sich bei grossen Enzymmengen und sehr grossen Umsätzen die Hemmung der Spaltprodukte geltend macht. Bei der von ihnen gewählten

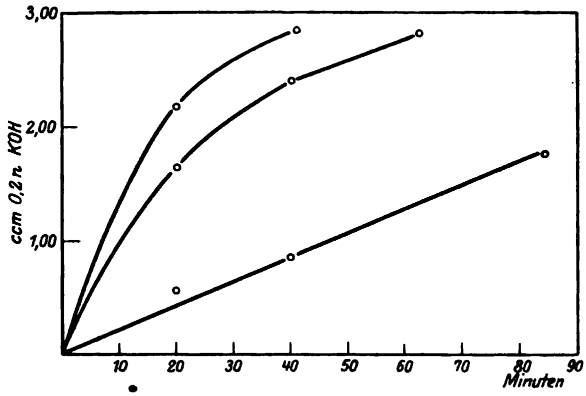


Fig. 55.

Temperatur 37° ist eine Enzymzerstörung nicht ausgeschlossen. Die für eine glatte Titration der Carboxyle nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz notwendige Kleinheit der Puffermenge ist auch für die Einhaltung der optimalen Acidität vielleicht nicht ausreichend. Eine Kurve sei angeführt (Fig. 55). Die Enzymmengen waren 0,23, 0,79 und 1,10 T-(e).

4. Einfluss der Substratkonzentration.

Dass die Spaltungsgeschwindigkeit bei einer konstanten Enzymmenge und variabler Substratkonzentration mit der letzteren steigt, aber nicht proportional, wiesen schon Henri und des Bancels nach. Bayliss bestimmte dann mit der Leitfähigkeitsmethode die Anfangsgeschwindigkeit der Spaltung von Casein.

% Casein	Änderung der Leitfähigkeit Recip. Megohm.
4	385
3,2	395
2	200
1,6	182
0,8	110
0,4	10

[1] Willstätter und Persiel, H. 142, 245; 1924/25.

Aus den Versuchen ist ersichtlich, dass die Geschwindigkeit anfangs mit der Substratkonzentration steigt, aber bei Konzentrationen grösser als etwa 3% einen konstanten Wert annimmt. In einem zweiten Versuche fand Bayliss dieselbe Geschwindigkeit in 4,5 und 8% Caseinlösungen, etwas kleiner in 10%. Die verminderte Geschwindigkeit in konzentrierteren Lösungen ist nach Bayliss bei der Gelatinespaltung noch mehr ausgeprägt. Er führt diese Erscheinung auf die vergrösserte innere Reibung zurück.

Neue Versuche verdankt man Northrop. Es muss indessen schon jetzt hervorgehoben werden, dass wir manchen Schlüssen, die Northrop aus seinen Versuchen zieht, nicht beipflichten können. Wenn er aus seinen Versuchen über Hemmung durch Verdauungsprodukte, wo gefunden wurde, dass die prozentische Hemmung von der Substratkonzentration unabhängig ist, den Schluss zieht, dass das Enzym mit dem Substrat keine Verbindung eingehe, so zieht er die Möglichkeit nicht in Betracht, dass Substrat und Hemmungskörper sich gar nicht notwendig gegenseitig verdrängen müssen. Aus modernen Versuchen mit anderen Enzymen ist leicht zu sehen, dass oft Hemmungen von der Substratkonzentration unabhängig sind und dass dies in vorzüglichster Übereinstimmung mit den Annahmen der Enzym-Substratverbindung ist. Die Hemmungsstoffe können ganz andere Gruppen besetzen als das Substrat und ihre Bindungen sind voneinander ganz unabhäng[1]): Die Hemmungskörper verhindern den Zerfall der Enzym-Substratverbindung[2]).

Von Northrops Versuchen über den Einfluss der Substratkonzentration sei folgende Tabelle angeführt:

Leitfähigkeitsmessung. Relative Geschwindigkeit, $C = \frac{100}{t}$; t ist die zum Erreichen einer kleinen Änderung der Leitfähigkeit erforderliche Zeit. E ist die relative Enzymmenge.

Wenn wir auf das Gleichgewicht Tryptase-Gelatine das Gesetz der Massenwirkung anwenden, finden wir leicht

$$C = \frac{E\,S}{Q + S}.$$

Hier ist S die Substratmenge, C die relative Menge an das Substrat gebundenes Enzym = die relative Reaktionsgeschwindigkeit; Q eine von der Gleichgewichtskonstante Enzym-Substrat und von den angewandten Einheiten abhängige Konstante. Setzen wir Q = 0,5, so erhalten wir die Werte „C berechnet".

Gelatine-menge S	C					
	E = 30		E = 5,0		E = 3,0	
	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.
0,38	13,1	12,0	2,4	2,0	1,3	1,3
0,75	17,5	18,0	3,3	3,0	1,8	1,8
1,5	25,6	22,5	4,0	3,7	2,2	2,2
3,0	28,4	25,7	4,6	4,3	2,4	2,6
6,0	27,3	27,7	4,9	4,6	2,7	2,7

[1] Siehe z. B. Euler und Svanberg, Fermentforschung, 4, 142; 1921.

[2] Myrbäck, Sv. Vet. Akad. Arkiv f. Kemi 8, Nr. 29 u. 32; 1923, H. 158, 160; 1926.

Wir sehen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit in Gelatinelösungen, konzentrierter als 3%, beinahe konstant ist. Dies dürfte also bedeuten, dass hier alle Tryptase an das Substrat gebunden ist. Nach Northrop ist indessen diese Annahme nicht richtig, da in einem Gemisch von 4% Casein und 3% Gelatine eine Reaktionsgeschwindigkeit gefunden wurde, die bedeutend grösser war als die in einer Lösung von 4% Casein gemessene, trotzdem Gelatine bedeutend langsamer verdaut wird als Casein. Offenbar ist es verfrüht, aus diesem Grunde die Annahme von der Verbindung Tryptase-Substrat zu verwerfen.

In einer anderen Versuchsreihe untersucht Northrop die Substratkurve mit Casein:

% Casein	0,5	1,0	2,0	3,0	5,0
Zunahme des Amino-Stickstoffs: ccm Lauge	0,20	0,38	0,45	0,54	0,55

Auch hier ist in etwa 3%iger Lösung die maximale Geschwindigkeit erreicht.

Diese Resultate gelten nun, wie Northrop hervorhebt, für die Bestimmungsmethoden, wo die Reaktionsprodukte ermittelt werden (Leitfähigkeitsmessung, Formoltitration, wahrscheinlich auch die alkalimetrische Titration in Alkohollösung). Bestimmt man dagegen das unveränderte Substrat (Fällungsreaktionen, Viscositätsmessung usw.), so erhält man ganz andere Resultate. Wir lassen einen Versuch über die Caseinverdauung bei verschiedenen Substratkonzentrationen folgen:

Casein wurde in einem m/20 Phosphat-Borat-Citrat-Puffer gelöst: pH = 8,0 Trypsinspaltung bei 34°. Casein gefällt und gewogen.

	Min. Verdauung			
	0	15	30	60
g Casein in 100 ccm	1,5	0,8	0,5	0,2
	3,1	1,9	1,2	0,8
	5,0	3,1	2,6	2,3

Wird hier als Anfangsgeschwindigkeit der reziproke Wert der Zeit zur Spaltung von 0,2 g Casein angesehen, so erhalten wir folgende Zusammenstellung:

Caseinkonzentration	Anfangsgeschwindigkeit
1,5%	12,5
3 "	22,2
5 "	40,0

Dasselbe Resultat wurde in mehreren Versuchen, auch wo Viscositätsmessungen zur Anwendung kamen, erhalten. Man findet also, wenn man die

erste Stufe der Tryptasewirkung misst, Proportionalität zwischen Geschwindigkeit und Substratmenge bei weit höheren Konzentrationen, als wenn man die Reaktionsgeschwindigkeit durch Bestimmung der Reaktionsprodukte ermittelt. Die Affinität zwischen Enzym und Casein ist also weit geringer, als aus den Seite 481 angeführten Versuchen mit variierender Gelatine- und Caseinkonzentration hervorzugehen scheint. In dieser Weise dürften sich Northrops Versuche über gleichzeitige Verdauung von Gelatine und Casein erklären.

Dass die mit verschiedenen Bestimmungsmethoden gewonnenen Resultate zur Zeit nur schwer vergleichbar sind, geht auch aus einer Zusammenstellung von Edlbacher[1] hervor.

Casein als Substrat.

Stunden Verdauung	% Formol-N vom Gesamt-N	CH_3-Gruppen auf 100 N-Atome	N-Methylzahl / Formolzahl
0	5	17	3,4
0,5	35,4	31,8	0,9
1	41,6	37,5	0,9
8	54,4	45,7	0,84
16	59,9	51,8	0,86
72	66,0	54,6	0,83

Anfangs ändert sich also die Menge des formoltitrierbaren Stickstoffes ausserordentlich schnell im Verhältnis zu der N-Methylzahl.

Es ist zu hoffen, dass die nunmehr gelungene Trennung der tryptischen Enzyme die genaue Kenntnis der Spaltungsprodukte ermöglichen und dadurch eine rationelle Untersuchung der Kinetik der Eiweissspaltung erlauben wird.

5. Reversion der Trypsinspaltung.

Wie mit anderen proteolytischen Enzymen tritt auch durch Trypsinpräparate in Gemischen von Eiweissspaltprodukten eine sog. Plasteinbildung ein. Ob man diesen Vorgang als eine Reversion der Trypsineinwirkung anzusehen hat, ist wohl sehr zweifelhaft. Wichtig ist, dass auch hier nach Henriques und Gjaldbäk[2] der Aminostickstoff abnimmt, dass also wirklich eine Synthese eintritt. Indem wir übrigens auf das beim Pepsin Gesagte verweisen, sei nur hier eine Zusammenstellung von Henriques angeführt:

---

[1] Edlbacher, H. 167, 52; 1919 und H. 108, 287; 1919/20.

[2] Henriques und Gjaldbäk, H. 71, 485; 1911 und H. 81, 439; 1912. — Wasteneys und Borsook, Jl Biol. Chem. 63, 15 u. 633; 1925.

	Pepsin-HCl	Trypsin
Peptische Spaltprodukte	Typische Plasteinbildung mit oder ohne Gelatinierung. Deutlicher Ausschlag für Synthese. Der Prozess geht beim Verdünnen zurück.	Typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung. Von einer Proteolyse und wahrscheinlich gleichzeitig von einer Synthese begleitet. Tryosinausscheidung.
Tryptische Spaltprodukte (stark gespalten). . . .	Keine Plasteinbildung. Proteolytische Spaltung.	Keine Plasteinbildung. Proteolytische Spaltung.
Säurespaltungsprodukte .	Typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung. Wahrscheinliche Synthese.	Typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung. Proteolytische Spaltung. Tyrosinausscheidung.
Alkalispaltprodukte. . . .	Typische Plasteinbildung ohne Gelatinierung. Proteolytische Spaltung.	Keine Plasteinbildung. Proteolytische Spaltung. Tyrosinausscheidung.

Zu bemerken ist, dass das „Trypsin" hier Erepsin enthalten hat.

F. Die Aktivitäts-pH-Kurve.

Die ersten genauen Versuche über die Bedeutung der Acidität für die Geschwindigkeit der Tryptasewirkung verdanken wir Sörensen[1]. Seine Versuche wurden mit Pancreatin Rhenania ausgeführt. Da dieses Präparat mehrere Enzyme zu enthalten schien und die von Sörensen angewandten Puffermischungen eine Verschiebung der Acidität während der Verdauung nicht verhindern konnten, gibt er keine pH-Kurve an. Danach haben Michaelis und Davidsohn[2] die Kurve unter Anwendung der Gaskettenmethode zur Messung der Acidität ermittelt.

Enzym: Pancreatinum puriss. absol. Rhenania.
Substrat: Peptonum siccum Riedel.
Methode: Formoltitration nach Sörensen.
Puffer: Phosphat- oder Acetatgemische.

Die Figur 56 zeigt den seitlichen Verlauf der Spaltung bei verschiedenen Aciditäten.

Es scheint hervorzugehen, dass die Kinetik mit der Acidität wechselt. Möglicherweise kann auch in einzelnen Fällen eine Enzymzerstörung mitspielen. In der Fig. 57 sind die relativen Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen Aciditäten durch eine Kurve veranschaulicht. Bei pH = 7,8 — 8,5 liegt die optimale Wirkung. (Die durch die OH- bzw. H-Ionen allein bewirkte Spaltung ist berücksichtigt worden.)

Zur Deutung der pH-Kurve werden nun die früheren Versuche über die

[1] Sörensen, Enzymstudien II, Bioch. Zs 21, 300; 1909.
[2] Michaelis und Davidsohn, Bioch. Zs 36, 280; 1911.

elektrochemische Natur des Trypsins von Michaelis und Davidsohn[1] herangezogen. Sie hatten durch Überführungsversuche gefunden, dass der isoelektrische Punkt des Trypsins bei pH = etwa $1,4 \cdot 10^{-4}$ liegt. Ungefähr bei derselben Acidität fanden sie das Flockungsoptimum der angewandten Trypsinlösung. Ausgefällt wurde das „Nucleoproteid“ des Pankreas. In dem Niederschlag befand sich die grösste Menge des Trypsins wahrscheinlich neben anderen Körpern. Michaelis und Davidsohn schliessen, dass zwar das Trypsin mit dem Nucleoproteid nicht identisch ist (dagegen spricht, dass man das Proteid ohne Trypsin in derselben Weise fällen kann), aber eine „leichte chemische Modifikation“ desselben darstellt[2]. Nach den neuen Erfahrungen über die Überführung der Enzyme im elektrischen Felde dürften die Versuche so zu deuten sein, dass der ausgefällte Körper eine Verbindung vom Enzym und Nucleoproteid ist, welche Verbindung auch die Lage des gefundenen isoelektrischen Punktes bestimmt hat. Über die elektrochemische Natur der Tryptase geben die Versuche keine Auskunft. Wenn also Michaelis den Schluss zieht, dass die pH-Kurve der Trypsinspaltung durch die elektrochemischen Eigenschaften des Enzyms bestimmt ist, so kann dies teilweise zutreffen; dass dagegen die Kurve ganz einfach die Dissoziationskurve des Enzyms ist, können die Versuche nicht beweisen.

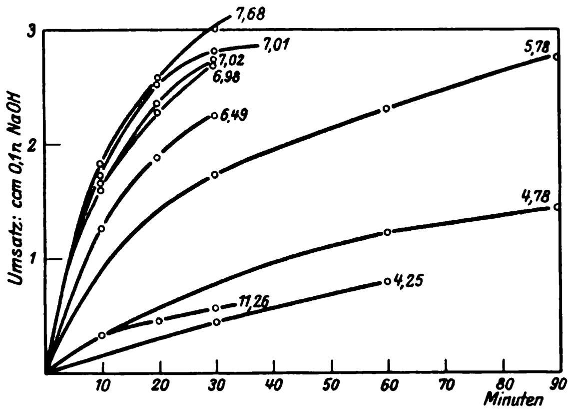


Fig. 56.

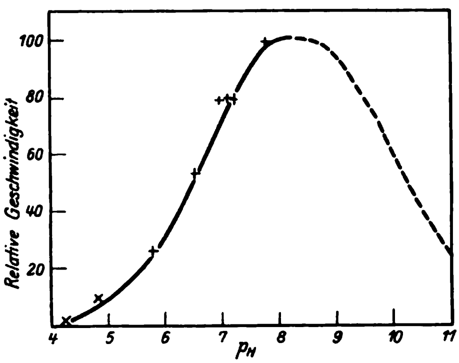


Fig. 57.

Wie bei Pepsin, hat es sich nämlich auch hier gezeigt, dass die pH-Kurve nicht dieselbe bei verschiedenen Substraten ist. Nachdem Euler[3] die Möglichkeit hervorgehoben hatte, dass der Dissoziationszustand der Proteine die Aciditätskurven der proteolytischen Enzyme teilweise bestimmen könnte, wies Northrop[4] nach, dass die Kurven tatsächlich je nach dem Substrat

[1] Michaelis und Davidsohn, Bioch. Zs 30, 481, 1911.
[2] Siehe hierzu auch Fodor, Fermentf. 4, 209; 1921.
[3] Euler, H. 51, 213; 1907.
[4] Northrop, Jl of gen. Physiol, V, 263; 1922.

verschieden waren und dass ein unverkennbarer Zusammenhang zwischen enzymatischer Wirkung und Grad der Salzbildung der Substrate existiert.

Durch pH-Bestimmungen in Mischungen von Protein und Lauge wurden die Ionisationskurven einiger Eiweissstoffe bestimmt. Mit denselben Stoffen als Substrat wurden dann die Geschwindigkeiten der Trypsinverdauung gemessen. So wurden z. B. folgende Kurven erhalten (Fig. 58). Die ausgezogenen Kurven sind die Ionisationskurven. Die Punkte sind die gefundenen Trypsinwirkungen. Eine sehr nahe Übereinstimmung der Punkte mit den Kurven ist bei mehreren Eiweissstoffen zu beobachten. In anderen Fällen ist die Übereinstimmung weniger gut.

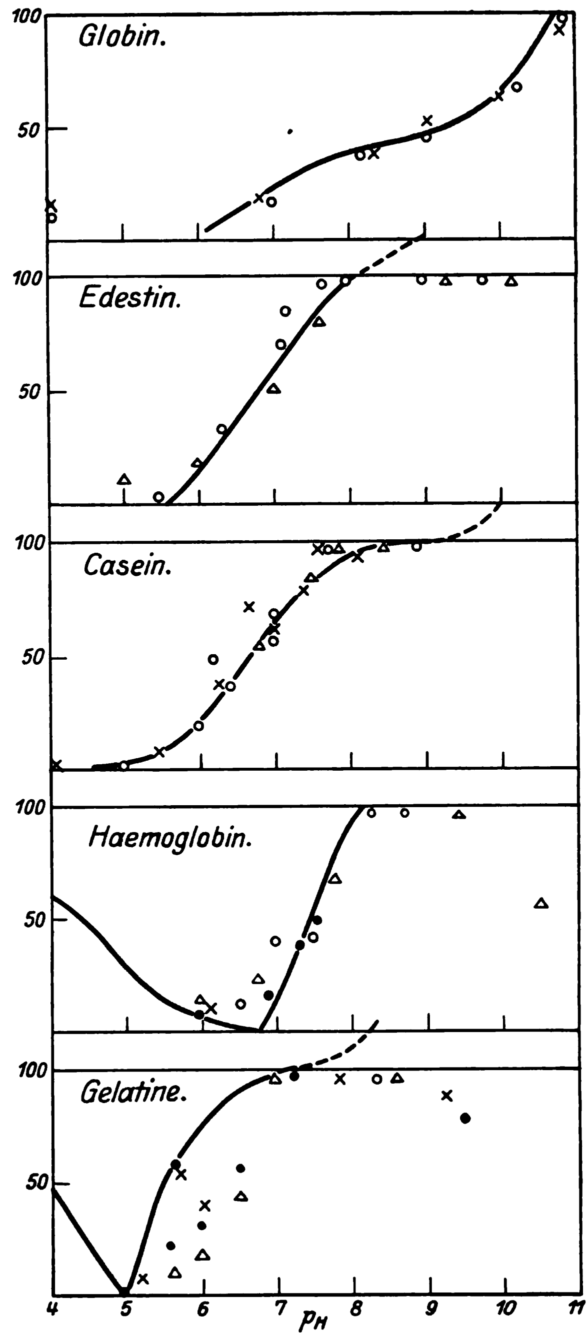


Fig. 58.

Nun kann es, wie Northrop selbst hervorhebt, oft schwer sein, die von einem Eiweissstoff maximal gebundene Alkalimenge zu berechnen. Die Eiweisse sind natürlich sehr oft mehrsäurig und die Dissoziationskonstanten können so nahe gleich sein, dass es schwer zu sagen ist, wo die erste Salzbildung vollständig ist. Dies kann in einigen Fällen die Übereinstimmung ungünstiger gemacht haben. Aus seinen Versuchen schliesst nun Northrop, dass die Substrate allein die pH-Kurven bestimmen, indem nur die Anionen derselben enzymatisch gespalten werden. Obgleich es ziemlich sicher sein dürfte, dass die Eiweissstoffe bei den in

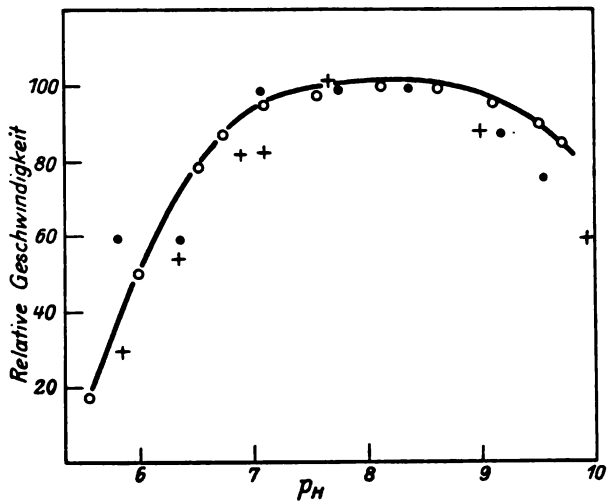
Frage kommenden Aciditäten recht vollständig in Ionenform vorhanden sind, dürfte man schwerlich behaupten können, dass die Ionisation der einzige bestimmende Faktor ist. Wir müssen beachten, dass in jedem Falle eine Enzym-Substratverbindung die zerfallende Molekülart ist und dass deren Eigenschaften vor allem die pH-Kurve bestimmen. Dagegen ist es richtig, dass die Salzbildung des Substrates für die Bildung der Enzym-Substratverbindung von ausschlaggebender Bedeutung sein kann. Nimmt man mit Northrop an, dass nur die Eiweissanionen gespalten werden, so ist zu schliessen, dass nur diese das Enzym binden. Wie bei Pepsin die Annahme mit den gefundenen Tatsachen in guter Übereinstimmung ist, dass sich die Säure Pepsin mit den Eiweisskationen verbindet (vgl. Kap. 20), so ist hier anzunehmen, dass sich die Base Tryptase mit den Eiweissanionen verbindet. Dadurch werden die verschiedenen pH-Kurven der Substrate erklärt, und die nach der zu einfachen Northropschen Annahme nicht verständlichen Abweichungen (u. a. der Abfall der Kurven in stärker alkalischer Lösung) werden den Eigenschaften des Enzyms bzw. der Enzym-Substratverbindung zugeschrieben.

Besonders hervorzuheben ist, dass in den Northropschen Versuchen für die Bestimmung der Spaltung der verschiedenen Substrate mehrere Methoden angewandt worden sind, die in manchen Fällen untereinander nicht vergleichbar sind, ein Umstand, der den Wert der Untersuchungen einigermassen beeinträchtigt. Mit einer einwandfreien Methodik hat Waldschmidt-Leitz neuerdings die Aciditätskurve der Gelatinespaltung ermittelt[1]. Er hat hier auch die Eigenwirkung des Puffers berücksichtigt, deren Vernachlässigung in früheren Arbeiten grosse Fehler bedingt hat[2]. Gemessen wurde die Wirkung von 0,125 g Trockenpankreas, durch Darmwandauszug maximal aktiviert, auf 10 ccm einer 3%igen Lösung von Gelatine bei 30°. Gemischter Phosphat-Borat-Citratpuffer nach Northrop. Angaben der Spaltung in ccm 0,2 n KOH (Fig. 59).

pH	Gesamthydrolyse	Pufferwirkung	Enzymwirkung
5,5	0,40	0,15	0,25
6,0	0,93	0,15	0,78
6,5	1,15	—	1,15
6,8	1,21	—	1,21
7,2	1,27	—	1,27
7,7	1,38	—	1,38
8,2	1,49	0,06	1,43
8,7	1,55	0,11	1,44
9,1	1,85	0,50	1,35
9,4	2,19	0,91	1,28
9,7	2,38	1,18	1,20

[1] Waldschmidt-Leitz, H. 132, 198; 1923/24.
[2] Siehe z. B. Ringer, H. 116, 107; 1921 und 124, 187; 1922/23.

Eine originelle Methode, die elektrochemische Natur der Tryptase kennenzulernen, hat Northrop in der letzten Zeit verwendet [1]. Sie gründet sich auf das sog. Donnan-Gleichgewicht, das Membrangleichgewicht von diffusiblen und nichtdiffusiblen Ionen. Um die Ionennatur eines Stoffes zu bestimmen, wird er in ein Donnan-System eingeführt und das Verhältnis seiner Konzentrationen zu beiden Seiten der Membran mit dem Verhältnis derselben Konzentrationen irgendeines bekannten Ions verglichen. Diese Methode hat nun Northrop im Falle von Trypsin geprüft, indem er die relative Konzentration in und ausser der in der Flüssigkeit aufgeschwämmten Gelatine mass. Er zieht aus seinen Versuchen den Schluss, dass Trypsin in Lösung zwischen



○ ○ Waldschmidt-Leitz.
● ● Northrop.
+ + Michaelis und Davidsohn.

Fig. 59.

pH 2,0 und 10,2 als monovalentes positives Ion zugegen ist. Bei pH = 10,2 ist es wahrscheinlich isoelektrisch, und in noch stärker alkalischer Lösung geht es in ein monovalentes negatives Ion über. Obgleich die Versuche an mehreren Schwächen leiden, ist unverkennbar, dass die Resultate in recht guter Übereinstimmung mit den Tatsachen stehen, auf die die Form der Aktivitäts-pH-Kurven hindeutet. Unregelmässigkeiten in den Versuchen von Northrop sind durchaus erklärlich, da die angenommenen Verhältnisse sicher allzu einfach sind und z. B. eine Bindung des Enzyms an das Substrat nicht angenommen wird.

Das pH-Optimum der Reversion, also der sog. Plasteinbildung haben neuerdings Wasteneys und Borsook [2] untersucht.

[1] Northrop, Jl of gen. Physiol. 6, 337; 1924.
[2] Wasteneys und Borsook, Jl Biol. Chem. 62, 15, 633 u. 675; 1925.

G. Einwirkung von Neutralsalzen.

Zwei Arten der Einwirkung sind denkbar:

1. Aktivierung des Trypsinogens,
2. Einwirkung auf das aktivierte Enzym.

1. Was den ersten Punkt betrifft, so hat die Theorie von der aktivierenden Wirkung der Kalksalze eine grosse Rolle gespielt. Delezenne fand, dass Erdalkalisalze in geringen Mengen den inaktiven Pankreassaft in eine aktive Form überführen können[1]. Zunz[2] bestätigte seine Angaben und sah in dem Vorgang einen katalytischen Prozess. Eine ganz andere Erklärung der Calciumwirkung geben Mellanby und Woolley[3]. Sie fanden, dass die Wirkung von Ca-Salz nur in einer Herabsetzung der Alkalität des Pankreassaftes durch Bildung von unlöslichen Carbonaten bestand. Dadurch wird die durch anwesende Enterokinase mögliche Aktivierung ausgelöst. Auch ohne Kalksalz geschah die Aktivierung, aber viel langsamer. Dies ist in sehr guter Übereinstimmung mit den neuen Befunden von Waldschmidt-Leitz, der gezeigt hat, dass die Kinasewirkung am besten in neutraler Lösung stattfindet[4]. In typisch unwirksamem Drüsenmaterial konnte er niemals eine Aktivierung durch Kalksalz beobachten. Überhaupt ist die Enterokinase durch keine bekannten Stoffe ersetzbar.

2. Zahllose Versuche über den Einfluss von Salzen auf die tryptische Verdauung sind nunmehr wertlos, da keine Rücksicht auf Aciditätsänderungen genommen wurde. Von Versuchen, wo wirklich eine Neutralsalzwirkung festgestellt wurde, seien die von Weiss[5] erwähnt. Er fand, dass NaCl in sehr kleinen Konzentrationen ein wenig förderte, in grösseren dagegen hemmte. So bewirkten 10% NaCl eine Hemmung von 13%. Eine ähnliche aber schwächere Wirkung haben die Bromide und Jodide von Kalium und Natrium. Stärker wirken dagegen die Oxalate und Sulfate. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen stehen die von Kudo[6]. Nach ihm hemmen die Nitrate noch weniger als die Chloride.

Ca-Salze hemmen die aktivierte Tryptase[4]. Ein Versuch von Waldschmidt-Leitz sei angeführt.

Verschiedene Tryptasepräparate, 3% Gelatine, Puffer.

Zusatz	Aciditätszuwachs in ccm KOH	pH
2 ccm Wasser	0,35	5,5
2 ccm Wasser + 40 mg $CaCl_2$ . . .	0,14	
1 ccm Kinase + 1 ccm Wasser . .	0,71	8,7
1 ccm Kinase + 1 ccm $CaCl_2$ = 20 mg	0,55	

[1] Delezenne, Soc. Biol. 59, 476, 523, 614; 60, 1070; 63, 274 (1907).
[2] Zunz, Bioch. Zbl. 5, 184, 599 und 6, 2154.
[3] Mellanby und Woolley, Jl of Physiol. 45, 370 und 46, 159; 1913.
[4] Waldschmidt-Leitz, H. 132, 200; 1923/24.
[5] Weiss, H. 40, 480; 1904.
[6] Kudo, Bioch. Zs 15, 473; 1909,

H. Reversible und irreversible Hemmungen (Giftwirkungen).

1. Anorganische Stoffe.

NaF ist auch hier mehrmals untersucht worden. Nach neueren Angaben von Vandevelde ist es ohne Einfluss[1]. Ältere Versuche sind durch Aciditätsänderungen zu erklären.

Kolloide Metalle hat Pincussohn studiert[2]. Sie sollen in verschiedener Weise einwirken, je nachdem sie Eiweiss als Schutzkolloid enthalten. Hier wäre wohl die Eigenwirkung der zugesetzten Eiweissstoffe zu berücksichtigen.

Interessant sind seine neuen Versuche[3] über die Einwirkung von kolloidalem Eisenhydroxyd auf Tryptase (Handelspräparat, Trypsin Rhenania.) Er fand, dass es je nach der Acidität der Lösung sowohl hemmend wie fördernd wirken konnte. In Lösungen saurer als pH = 6,3 förderte es, bei pH = 6,5—6,7 war es unwirksam, in alkalischerer Lösung hemmte es. Dies ist wohl mit den amphoteren Eigenschaften des Enzyms in Verbindung zu setzen. Der Zusammenhang ist doch, wie Pincussen hervorhebt, gar nicht klar.

H_2O_2 soll günstig wirken[4]. Dies gilt natürlich von mässigen Mengen und ist vielleicht als eine Wirkung auf das Substrat aufzufassen.

1 g Dinatriumsulfit in 100 ccm Verdauungsgemisch hemmt die Tryptase nicht wesentlich[5].

Dasselbe gilt von einem Zusatz von 1 g Cyankalium, 2 g KCN hemmen deutlich. Auch nach Hata[6] sind kleine Mengen von KCN unschädlich.

Wichtig sind die allerdings mit einer recht groben Methodik angestellten Versuche von Hata über die Quecksilbervergiftung der Tryptase (Grüblers Trypsin sicc.). Schon sehr kleine Mengen $HgCl_2$ haben eine deutliche hemmende Wirkung. Etwas grössere Mengen vergiften vollständig. So heben 2 mg $HgCl_2$ die Wirkung von 1 mg Trypsin Grübler recht vollständig auf. Sehr interessant ist nun, dass es Hata gelang, die Hg-vergiftete Tryptase durch KCN zu regenerieren. Zu einer Lösung von 1 mg Trypsin wurden 20 mg $HgCl_2$ gegeben. Die Vergiftung ist hier vollständig, wie auch besondere Versuche zeigten. Nach einer Stunde setzte man 9,7 mg KCN dazu. Es zeigte sich, dass beinahe die ganze enzymatische Wirkung zurückgewonnen wurde.

Weitere Versuche über Schwermetallhemmung bei Chittenden[7].

2. Organische Verbindungen.

Mit sog. Protoplasmagiften hat Kaufmann[8] eine Untersuchung ausgeführt. Er fand, allerdings nach einer groben Methode, dass stärkere Trypsinlösungen (0,2 % Grüblers

[1] Vandevelde und Poppe, Bioch. Zs 28, 134; 1910.
[2] Pincussohn, Bioch. Zs 40, 307; 1912.
[3] Pincussen, Bioch. Zs 142, 212; 1923.
[4] Vandevelde, Hofm. Beitr. 5, 558.
[5] Elisabeth Rona, Bioch. Zs 109, 284; 1920.
[6] Hata, Bioch. Zs 17, 156; 1909.
[7] Chittenden und Cummius: Trans. Conn. Akad. 7; Malys Jahresber. 1885, 304.
[8] Kaufmann, H. 39, 434; 1903.

Trypsin) durch 24stündige Einwirkung von Toluol, Chloroform und Thymol nicht merkbar geschädigt wurden. Schwächere Lösungen wurden dagegen deutlich beinflusst. Ausser dieser Schädigung, die wohl als ein beschleunigter Zerfall des Enzyms zu betrachten ist, ist auch nach Kaufmann die Anwesenheit antiseptischer Stoffe während der Verdauung schädlich, doch nicht in hohem Grade.

Über den Einfluss von Alkohol auf die Trypsinverdauung von Casein und Fibrin hat Edie[1] eine Untersuchung veröffentlicht. Er findet, dass Äthylalkohol in Konzentrationen grösser als 8% die Fibrinverdauung stark hemmt, während die Wirkung des Trypsins auf Casein erst bei 10% Alkohol deutlich beeinflusst wird. Die Alkoholwirkung besteht nicht in einer irreversiblen Zerstörung des Enzyms. Edie schliesst, dass, wenn die Tryptase ein einheitliches Enzym ist, die Wirkungen auf Casein und Fibrin von verschiedenen „Seitenketten" ausgeübt wird. Nun ist indessen zu bemerken, dass die Spaltung einerseits gelöstes Casein andererseits festes Fibrin betraf. Obgleich der Verfasser zeigen konnte, dass das Fibrin durch die angewandten Alkoholkonzentrationen nicht dauernd verändert wurde, ist es wohl sehr möglich, dass die verschiedene Wirkung des Alkohols einer Wirkung auf das feste Fibrin zuzuschreiben ist.

Johannessohn[2] hat die Einwirkung von Formaldehyd untersucht, und zwar die Einwirkung auf Enzym und auf Substrat getrennt. Er fand, dass verschiedene Trypsinpräparate von Formaldehyd ungleich stark beeinflusst wurden, was wohl mit dem verschiedenen Gehalt an Verunreinigungen zusammenhängt. So wurde beispielsweise Trypsin Merck durch 20stündige Behandlung mit 1% Formaldehyd unwirksam, ein anderes Präparat, „Trypsinogenum activatum Pharmacon", wurde schon von 1/20% inaktiviert. Die Verdauung von mit Formaldehyd behandeltem Eiweiss („Methyleneiweiss") mit Trypsin war nicht erheblich kleiner als die des unvorbehandelten Eiweisses. Die Versuche von Johannessohn sind in Übereinstimmung mit älteren von Loew[3] und von Bliss und Novy[4]. Über die Verdauung von Formoleiweiss findet man auch Versuche bei Sahli und Rumpel[5].

Von anderen untersuchten Aldehyden wirkt Paraldehyd nach Chittenden und Stewart[6] stark schädigend. Bei denselben Verfassern findet man Untersuchungen über die Giftwirkungen von einer Menge von Arzneimitteln usw. auf die Tryptase.

Über Einwirkung von Kolloiden siehe Versuche von Simoneli[7]. Die

---

[1] Edie, Bioch. Jl 13, 219; 1919.

[2] Johannessohn, Bioch. Zs 83, 28; 1917.

[3] Loew, Malys Jahresber. 1888, 272.

[4] Bliss und Novy, Jl of exp. med. 4, 47.

[5] Sahli, Deutsche med. Wochenschrift 1897, 7. — Rumpel, Therap. Monatsh. 1906, 369.

[6] Chittenden und Stewart, Malys Jahresber. 20, 248; 1890.

[7] Simoneli, Arch. di Fis. 8, 17; 1910.

hier gefundenen Aktivierungen dürften auf Schutzwirkung gegen Zerstörung des Enzyms beruhen.

Bezüglich der sehr umstrittenen Wirkung der Galle auf die Tryptase hat neuerdings Waldschmidt-Leitz festgestellt, dass in dem Aciditätsgebiet optimaler Wirkung die Glykocholate wirkungslos sind[1]. Bei saurer Reaktion hemmen sie dagegen.

		Aciditätszunahme
pH = 5,5	Ohne Gallensalz	0,35 ccm 0,2 n KOH
	40 mg Na glycocholicum	0,05 „ 0,2 „
pH = 8,7	Ohne Gallensalz	1,55 „ 0,2 „
	40 mg „	1,58 „ 0,2 „

Die älteren Arbeiten, wo oft eine spezifische Aktivierung der Tryptase durch Galle gefunden wurde, sind ohne Berücksichtigung der Acidität ausgeführt. Die Aktivierungen dürften ausschliesslich auf der günstigen Wirkung der alkalischen Reaktion der Galle beruhen. Dies geht aus den Versuchen von Fürth[2] hervor, wie auch aus den oben angeführten von Waldschmidt-Leitz.

Ca-Oleat ist nach Willstätter und Persiel wirkungslos[3].

3. Antitrypsin.

Die Existenz der Antitrypsine ist sehr zweifelhaft. Sicher ist dagegen, dass es z. B. im Blutserum Stoffe gibt, welche die Trypsinwirkung und vielleicht auch die Wirkung anderer Proteasen hemmen. Nichts spricht indessen dafür, dass die Wirkung dieser Stoffe sich prinzipiell von den Hemmungen durch Spaltprodukte usw. unterscheidet. Ist es somit wahrscheinlich, dass diese „normalen" Antitrypsine keine Sonderstellung einnehmen; so kommt die zweite Frage, ob es möglich ist, ein Immun-Antitrypsin hervorzurufen.

„Normale Antitrypsine".

Dass das normale Blutserum eine starke Hemmung der Trypsinverdauung bedingt, ist lange bekannt. Gezeigt wurde, dass die Hemmung der Albuminfraktion des Serums folgt[4]. Obgleich es, wie Hedin hervorhebt, möglich ist, dass Stoffe, welche dem Serumalbumin anhaften, für die Hemmung verantwortlich sind, so dürfte nunmehr sicher sein, dass die hemmende Wirkung von dem Serumalbumin selbst ausgeübt wird. Studien über diese Hemmung verdanken wir besonders Hedin[5]. Im Anschluss an die damals herrschenden Ideen über die Bedeutung der Sorption für die enzymatischen Wirkungen nimmt Hedin an, dass die Hemmung des Serumalbumins auf sorptiver Bindung des Enzyms beruhe. Wenn man Enzym und Antienzym zuerst

[1] Waldschmidt-Leitz, H. 132, 201; 1923/24.
[2] Fürth, Hofm. Beitr. 9, 28; 1907.
[3] Willstätter und Persiel, H. 142, 253; 1924/25.
[4] Landsteiner, Zbl f. Bakt. 27, 357; 1900. — Cathcart, Jl of Physiol. 31, 495; 1904.
[5] Hedin, Jl of Physiol. 32, 390; 1905; Bioch. Jl. 1, 474; 1906, H. 52, 412; 1907 und 57, 468: 1908.

mischt und dann das Substrat zusetzt, so zeigt sich die Hemmung von der Zeit der Aufbewahrung des Enzym-Antienzymgemisches abhängig. Die Hemmung ist grösser, wenn man die Mischung bei einer höheren Temperatur vornimmt usw. Hedin fand, dass die Sorption des Trypsins an Kohle mit der Hemmung des Serumalbumin so viele Ähnlichkeiten aufweist, dass nach seiner Ansicht auch diese Hemmung wahrscheinlich auf Sorption beruht.

Eine neue Untersuchung, bei der eine recht gute Methode zur Messung der Trypsinwirkung angewandt wurde, verdankt man Hussey und Northrop[1]. Sie fanden, dass die Hemmung durch Serum mit ihrer Methode quantitativ gemessen werden konnte. Durch eine grosse Anzahl Versuche stellten sie fest, dass das Gleichgewicht Enzym-Hemmungskörper praktisch momentan erreicht wurde und vollkommen reversibel ist. Durch Versuche mit variierenden Konzentrationen von Enzym und Antienzym fanden sie dass die Hemmung sich aus der Gleichung

$$\frac{[\text{Trypsin}] \times [\text{Antitrypsin}]}{[\text{Verbindung}]} = K$$

berechnen lässt und sich also prinzipiell in keiner Hinsicht von der Hemmung durch Spaltungsprodukte usw. unterscheidet.

Zur Erklärung zahlreicher Widersprüche in älteren Untersuchungen ist eine Arbeit von Young[2] von grossem Interesse. Er zeigt, dass dasselbe Serum auf verschiedene Trypsinlösungen von derselben enzymatischen Wirkung eine sehr verschiedene Hemmung ausüben kann. Dies beruht wohl auf gewissen, in den Enzymlösungen anwesenden enzym- oder albuminbindenden Verunreinigungen. Um darum die antitryptische Wirkung verschiedener Sera vergleichen zu können, muss man dieselbe Trypsinlösung anwenden und die Bestimmungen möglichst gleichzeitig ausführen, damit sich die Enzymlösung durch Selbstverdauung nicht ändern kann.

Die Hemmungen durch Sera und andere „antitryptisch“ wirksame Präparate dürften folgendermassen beschrieben werden können:

1. Es gibt Stoffe, die in keiner Weise spezifisch wirken und sich nicht einmal an das Enzym binden, welche aber für die Enzymwirkung ungünstige Bedingungen schaffen. Hier sind also die Versuche zu nennen, in denen antitryptische Wirkungen solchen Stoffen zugeschrieben wurden, deren einzige Wirkung eine Aciditätsverschiebung ist.

2. Das Enzym bindet sich wie an die spaltbaren Substrate so auch an andere mehr oder weniger eiweissähnliche Stoffe, die nicht oder nur sehr langsam gespalten werden. Dadurch wird ein Teil des Enzyms dem Substrat entzogen und die Trypsinwirkung wird so gehemmt.

3. Es gibt Stoffe, die sich wie die Co-Tryptase an das Enzym anlagern und dadurch die Co-Tryptase verdrängen.

[1] Hussey und Northrop, Jl of gen. Physiol. 5, 335; 1923.
[2] Young, Jl Biochem. 12, 499; 1918.

Das Immun-Antitrypsin.

Die Existenz eines Immun-Antitrypsins ist sehr zweifelhaft.

Achalme[1] fand nach Injektion von Pankreatin die Hemmung durch Meerschweinchenserum bedeutend verstärkt. Diese Versuche wurden u. a. von Jochmann und Kantorowicz[2] und von Meyer[3] bestätigt. Dagegen konnten Landsteiner[4], Doblin[5], Rosenthal[6] und andere keine Vergrösserung der antitryptischen Wirkung nach Injektion beobachten. Aus einer neuen Untersuchung von Young[7] seien einige Resultate mitgeteilt. Er hat die antitryptische Wirkung des Serums gewisser Tiere vor und nach Injektion von Pankreastrypsin gegen dieselbe Trypsinlösung geprüft. Dies wurde dadurch ermöglicht, dass die Sera eingetrocknet wurden und also beliebig lange aufbewahrt werden konnten. Durch besondere Versuche wurde festgestellt, dass hierbei keine Veränderung der antitryptischen Eigenschaften eintrat. Vor der Einspritzung wurden mit einer Zwischenzeit von einer Woche zwei Serumproben entnommen. In einem Versuch wurden an drei aufeinander folgenden Tagen 20 ccm Trypsinlösung einer Ziege intraperitoneal eingespritzt. Nach sieben Tagen wurde eine Serumprobe genommen, welche wie die vor der Einspritzung genommenen Proben untersucht wurde.

Caseinspaltung bei 37° 16 Stunden. Fällung des unveränderten Caseins durch Gerbsäure nach Hedin. Bestimmung von N im Filtrat. Die Angaben sind ccm 0,10 n-Säure bei der Titration des NH_3 nach Kjeldahl.

ccm Serum	Tryptische Wirkung		
	vor der Injektion		nach der Injektion
	Probe 1	Probe 2	
—	18,9	18,9	18,9
0,01	18,4	18,1	18,2
0,05	16,8	16,4	17,5
0,10	15,9	15,2	16,3
0,25	10,6	11,0	13,0
0,50	6,5	6,2	6,2
1,00	5,0	4,8	4,5
2,50	4,7	4,6	4,1
5,00	3,9	3,1	3,4

Die antitryptischen Wirkungen sind gar nicht vergrössert worden. Dasselbe Ergebnis gaben Versuche mit intravenösen Injektionen. Versuche, bei

[1] Achalme, Ann. Inst. Pasteur. 15, 737; 1901.
[2] Jochmann und Kantorowicz, Münch. med. Wochenschr. 45, 1348; 1908.
[3] Meyer, Berl. klin. Wochenschr. 28; 1909. — Biochem. Zs 23, 62; 1909. — Folia Serolog. 7, 472; 1911.
[4] Landsteiner, Zentralbl. Bakt. 27, I, 357; 1907.
[5] Doblin, Zs Immunitätsforsch. 1, 650; 1909.
[6] Rosenthal, Folia Serolog. 6, 285; 1910.
[7] Young, Biochem. Jl 12, 499; 1918.

denen die Bedingungen variiert wurden (eingespritzte Menge, Anzahl Einspritzungen, Zeit zwischen den Einspritzungen usw.) mit Ziegen und Schafen konnten auch in keinem Falle Anhaltspunkte für die Bildung eines Antikörpers liefern.

Dagegen zeigte es sich, dass die Sera, welche vor der Einspritzung mit der Enzymlösung keinen Niederschlag gaben, nach der Einspritzung regelmässig beim Vermischen mit der Pankreatinlösung einen deutlichen Niederschlag auftreten liessen. Eine Präcipitinbildung ist also eingetreten. Dabei sind nur die Verunreinigungen der eingespritzten Enzymlösung wirksam gewesen.

J. Stabilität der Tryptase.

Tryptaselösungen, vor allem wenn sie gereinigt sind, besitzen nur eine relativ geringe Stabilität. Dies zeigt sich schon beim Aufbewahren der Lösungen bei Zimmertemperatur. Unreine Lösungen sind mehr stabil. Vollkommen stabil sind die Pankreastrockenpräparate. Die Instabilität der Tryptase zeigt sich augenfällig bei der Dialyse.

Bezüglich der Dialyse kann man zuerst feststellen, dass sehr leicht eine Inaktivierung eintritt, sei es durch Zerstörung in Lösung oder durch Sorption an der angewandten Membran. Eine zweite Frage ist, ob die Tryptase die gewöhnlichen Membranen passieren kann. Hier sind die Versuche einander recht widersprechend. Strada[1] filtrierte Pankreatinlösungen durch Kollodium und fand die grösste Menge der Tryptase im Filtrat, während die Kinase bisweilen zurückgehalten wurde. Aus neueren Untersuchungen geht hervor, dass für das Zurückhalten der Tryptase die Dicke der Kolloidummembran wesentlich ist[2]. Durch dünne Häute passiert das Enzym recht schnell. Durch Dialyse in dicken Schläuchen kann eine gewisse Reinigung des Enzyms erzielt werden. So fand beispielsweise Northrop, dass recht viele Verunreinigungen durch Dialyse entfernt werden konnten.

Die verhältnismässig schnelle Inaktivierung der Tryptase in Lösung auch bei niederen Temperaturen beobachtete Bayliss. Er fand Zerstörung sogar bei 0°. Bei Anwesenheit von Proteinen dagegen waren die Lösungen nach 7 oder 8 Stunden bei 38° unverändert. Eine starke Schutzwirkung ist also hier zu beobachten, sei es, dass sie von dem Substrat ausgeübt wird oder von den natürlich sehr schnell durch die Tätigkeit des Enzyms entstehenden Spaltprodukten.

Den zeitlichen Verlauf der Inaktivierung des Trypsins hat Vernon[3] untersucht. Er fand, dass die Reaktion nicht monomolekular verläuft, sondern sich mit der Zeit zu stark verlangsamt. Er nahm an, dass dies auf der Anwesenheit von verschiedenen Tryptasen mit verschiedenen Stabilitäten beruhe. Er fand indessen auch, dass die Verunreinigungen einen starken

[1] Strada, Annales de l'Inst. Pasteur 22, 981; 1908.

[2] Fricke, Fischer und Borchers, Kolloidzeitschr. 39, 152; 1926. — Daselbst auch Versuche über Elektrodialyse des Trypsins.

[3] Vernon, Jl of Physiol. 30, 330; 1904.

Einfluss auf die Zerstörungsgeschwindigkeit ausübte, und, wie neuere Untersuchungen zeigen, erklärt dieser Umstand die Vernonschen Versuche vollständig, wodurch die Annahme von verschiedenen Tryptasen überflüssig wird.

Northrop[1] zeigte, dass die Schwächung der Tryptaselösungen wirklich eine Inaktivierung des Enzyms ist und nicht eine Sorption an den Wänden des Gefässes. Er wies nach, dass die Inaktivierung unter übrigens denselben Verhältnissen gleich gross war, gleichgültig, ob man Gefässe aus Glas, Quarz, Paraffin oder Platin verwendet.

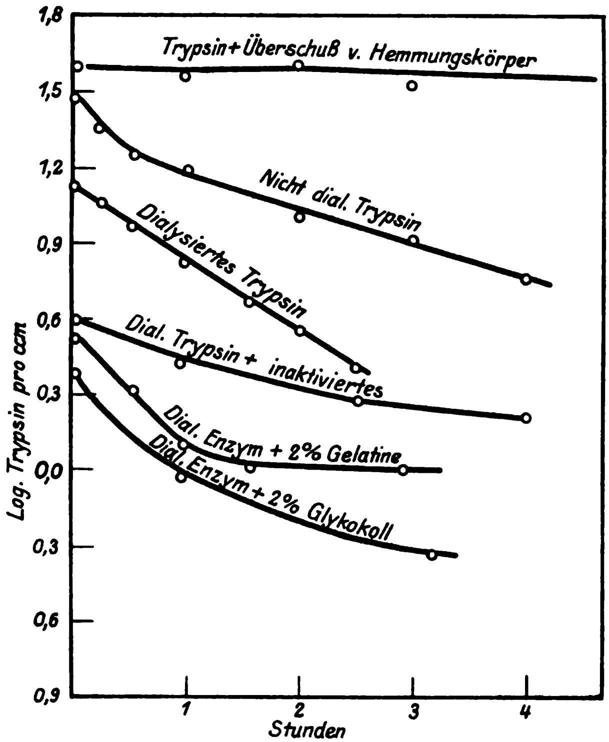


Fig. 60.

Die Hitze-Inaktivierung verläuft in reineren Enzymlösungen approximativ nach der monomolekularen Formel (38°). Durch Zusatz von tryptischen Abbauprodukten, welche die Trypsinverdauung hemmen, wird die Zersetzungsgeschwindigkeit herabgesetzt. Dies ist in Übereinstimmung mit der Annahme einer Verbindung Enzym-Hemmungskörper. Dass ein Zusatz von Hitze-inaktivierter Enzymlösung auch schützend wirkt, ist auch in Übereinstimmung damit, dass man hemmende Körper in rohen Enzymlösungen angenommen hat. Wir führen eine Figur aus der Northropschen Arbeit an (Fig. 60).

Bei der dialysierten Enzymlösung geht der Zerfall monomolekular. Lösungen von nicht dialysiertem Enzym und solche mit Zusatz von Gelatine werden anfangs schnell zerstört; die Geschwindigkeit wird indessen mit der Zeit stark verkleinert. Trypsinlösungen, die einen Zusatz von inaktiviertem Enzym oder von „Hemmungskörpern" erhalten haben, sind viel stabiler. Glykokoll ist ohne Einfluss. Bei Anwesenheit von Überschuss von Hemmungskörpern ist das Trypsin so stabil, dass die Zerfallsgeschwindigkeit des freien Enzyms bei 38° erst oberhalb 60° erreicht wird.

Northrop hat schliesslich die Abhängigkeit der Hitzeinaktivierung von der Acidität untersucht. Einstündige Erhitzung auf 38°; Fig. 61. Das Trypsin,

[1] Northrop, Jl of Physiol. 4, 261; 1922.

oder vielleicht richtiger eine Trypsinverbindung mit einem unbekannten Begleitstoff, ist bei pH = 5 am stabilsten. Die Verbindung von Trypsin mit dem zugesetzten Hemmungskörper hat ihr Stabilitätsoptimum bei pH = etwa 6. Wahrscheinlich hat jede diesbezügliche Verbindung je nach ihren elektrochemischen Eigenschaften ihr Stabilitäts-pH-Optimum.

Dass Trypsin bei auffallend niedrigen Temperaturen zerstört wird, geht übrigens aus vielen Untersuchungen hervor. So fand Heidenhain[1] schon

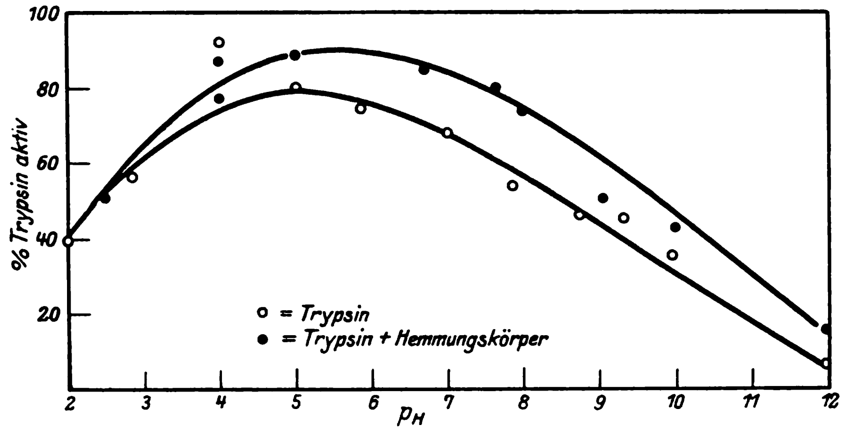


Fig. 61.

bei 35° Zerstörung. Bei 37° fand Pfeiffer[2] vollständige Zerstörung in 24 Stunden, in 6 Stunden bei 56°.

Die sog. Optimaltemperatur beruht hier wie überall auf dem Verhältnis zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Zerstörungsgeschwindigkeit (vgl. Teil I, 3. Aufl., S. 280). Im pH-Optimum liegt sie oberhalb 55°, z. B. in alkalischen Lösungen liegt sie niedriger.

Strahlenwirkungen.

Ultraviolettes Licht schädigt (Delezenne[3]).

Radioaktive Strahlung schädigt nach Hussey und Thompson[4]. Eine recht schwache Wirkung von weichen Röntgenstrahlen haben Clark und Northrop untersucht[5]. Sie setzen die Wirkung auf das Enzym mit der ionisierenden Wirkung der Strahlung in Zusammenhang.

[1] Heidenhain, Pflügers Arch. 10, 557; 1875.
[2] Pfeiffer und Standenath, Fermentf. 7, 14; 1924.
[3] Delezenne und Lisbonne, C. r. 155, 788; 1912.
[4] Hussey und Thompson, Jl of gen. Physiol. 5, 647 und 6, 7; 1923.
[5] Clark und Northrop, Jl of gen. Physiol. 9, 87; 1925.

19. Kapitel.

Die Co-Tryptase (Enterokinase).

Der spezifische Aktivator der Tryptase, die Enterokinase oder, wie man ihn in Analogie mit den übrigen Co-Enzymen nennen sollte, die Co-Tryptase, ist nunmehr, besonders durch die Untersuchungen von Waldschmidt-Leitz gut bekannt geworden. Im folgenden wird auf Grund der Arbeiten dieses Forschers über die wichtigsten Ergebnisse berichtet.

A. Vorkommen der Co-Tryptase (Enterokinase).

Ausser in der Dünndarmschleimhaut, wo die Enterokinase zuerst entdeckt wurde, kommt sie auch in der Pankreasdrüse selbst vor und bewirkt die sog. Spontanaktivierung der Tryptase. Aus anderen Organen, wie Milz, Leber und Niere, gelang es Waldschmidt-Leitz nicht, nach der Autolyse aktivierende Lösungen zu erhalten. Das Vorkommen der Co-Tryptase ist also, soweit wir wissen, auf die Pankreasdrüse und die Darmschleimhaut beschränkt. In der Drüse kommt die Co-Tryptase in einer unfertigen Form (Prokinase) vor. Daher kommt es, dass sezernierter Pankreassaft und frische Drüsenextrakte fast inaktiv sind. Beim Aufbewahren der Trypsinogenlösung treten autolytische Prozesse ein, wodurch die Prokinase in die aktivierende Form, die Co-Tryptase übergeführt wird. Ob hierbei das Erepsin eine Rolle spielt, ist unsicher, aber wohl möglich. Die Pankreaskinase und die Darmkinase stimmen in ihren Eigenschaften weitgehend überein und sind aller Wahrscheinlichkeit nach identisch.

Wie in älteren Arbeiten [1] u. a. gezeigt worden war, findet man keine Kinase in der Darmschleimhaut mehr, wenn man den Eintritt des Pankreassekretes in den Darm verhindert. Auf Grund dieses Befundes stellt nun Waldschmidt-Leitz die Arbeitshypothese auf, dass die Kinase in unfertiger Form von der Pankreasdrüse abgesondert, dann aber im Darm von der Schleimhaut aufgenommen wird, und dass sie hier durch die Tätigkeit eines Enzyms, möglicherweise des Darmerepsins, in wirksame Co-Tryptase übergeführt wird.

B. Bestimmung der Co-Tryptase.

„Die stöchiometrischen Beziehungen zwischen Enterokinase und Trypsin führen zu einer einfachen Bestimmungsmethode für den Aktivator: man ver-

[1] Siehe z. B. Sawitsch, Soc. des Med. russes. St. Petersburg 1900/01. — Foà, Biochem. Zbl. 7, 2332.

gleicht die einer bestimmten Menge inaktiven Trypsins erteilten proteolytischen Wirkungen, z. B. gegenüber Gelatine." Nun wird indessen diese einfache Methodik dadurch ungenau, dass die Pankreaspräparate (Trypsin) Co-Tryptase enthalten oder wenigstens mit der Zeit bilden. Es ist also für die Bestimmung der Co-Tryptase notwendig, zuerst nicht nur ein Co-Tryptase-freies, sondern auch ein Prokinase-freies Trypsinpräparat herzustellen. Noch schwieriger wird die Bestimmung dadurch, dass sich in den Drüsenauszügen auch Stoffe finden, welche die Kinasewirkung hemmen. Versuche, die Einwirkung dieser Stoffe durch Einführung einer ausgleichenden Hemmung auszuschalten, haben noch nicht zum Ziele geführt. Dagegen ist es Waldschmidt-Leitz gelungen, die Tryptase und die Prokinase zu trennen, und zwar durch mehrmalige Sorption mit Tonerde (Sorte C, aus $Al_2(SO_4)_3$ durch Fällen ohne längeres Erhitzen mit der vierfachen Menge 4% NH_3), wobei die Tryptase in der Restlösung bleibt.

Beispiel: Spontanaktivierung und Tonerdesorption (Angaben bedeuten die Wirkung aliquoter Teile, in ccm 0,2 n KOH ausgedrückt).

Enzymlösung	Beobachtete Wirkung nach 0 Tagen	2 Tagen	3 Tagen
Verdünnter Glycerinauszug	0,03	0,19	0,27
Adsorptionsrestlösung	0,00	0,02	0,01
Adsorptionsrestlösung + Elution	0,02	—	0,41

Die Abtrennung der Prokinase bringt auch mit sich, dass die Tryptase sehr viel beständiger wird, als wenn sie die Selbstaktivierung durchmacht.

C. Co-Tryptase-Präparate.

Ausgangsmaterial.

In den älteren Arbeiten über Enterokinase wurden einfach Wasser- oder Glycerinextrakte der Darmschleimhaut verwendet[1]. Um ein haltbares Ausgangsmaterial zu erhalten, stellt man sich am besten ein Trockenpräparat nach Waldschmidt-Leitz her (H. 132, 204):

„Aus 685 m Schweinedarm, vom obersten Abschnitt des Dünndarms ebensovieler Tiere, schabte man die innerste weiche Schleimhaut mit dem Messer so vorsichtig ab, dass sie möglichst frei von Bindegewebe und Muskelfaser war, und erhielt so insgesamt 7,16 kg; diese wurden darauf in 5 Flaschen mit im ganzen 21 Liter Aceton gut durchgeschüttelt und nach 2 stündigem Stehen filtriert. Der Filterrückstand wurde dann weiter durch Anschütteln in den Flaschen und Filtrieren wie zuvor mit 21 Liter Aceton, darauf mit 10,5 Liter Aceton + 10,5 Liter Äther und zuletzt 2 mal mit je

[1] Vernon, Jl of Physiol. 28, 375; 1902. — Bayliss und Starling, ebenda 30, 61; 1903.

21 Liter Äther gewaschen und auf Filtrierpapier an der Luft getrocknet. Man erhielt so 1,05 kg eines feinen farblosen Pulvers, das sich nach dem Mahlen in einer Schlagmühle mittels eines engmaschigen Siebes noch von geringen Mengen beigemischter Fasersubstanz befreien liess; die Ausbeute bestand in 950 g staubfeinen Materials.“

Dieses Pulver enthält viel Enterokinase, aber nur wenig Erepsin. Reinigung nach Waldschmidt-Leitz: Aus dem Trockenpräparat wird die Co-Tryptase leicht durch alkalisches Wasser extrahiert. Laugt man dagegen mit schwacher Säure aus, so geht wenig Co-Tryptase aber viel Erepsin in Lösung. Beim Behandeln des Rückstandes mit verdünntem Ammoniak erhielt man die Co-Tryptase in guter Ausbeute in Lösung, frei von Erepsin. Aus der ammoniakalischen Lösung kann viel Eiweiss usw. mit verdünnter Essigsäure entfernt werden ohne wesentlichen Verlust an Co-Tryptase. Weitere, obgleich nicht grosse Mengen von Begleitstoffen, lassen sich durch Fällung mit Sublimat entfernen. Bei Fällung mit Blei- oder Eisensalzen dagegen wird recht viel Co-Tryptase mitgerissen.

Durch Uranylacetat wird die ganze Menge Co-Tryptase mit einem grossen Niederschlage gefällt. In guter Ausbeute kann man sie aus dem Uranniederschlag durch glycerinhaltige alkalische Phosphatlösung eluieren.

Aus dem Rohauszug kann die Gesamtmenge der Co-Tryptase mit Tannin gefällt werden (schwachsaure Reaktion). Die Lösung des Tanninniederschlages in verdünntem Ammoniak enthält beinahe allen Aktivator. Auch reinere Lösungen werden von Tannin mehr oder weniger vollständig gefällt. Gegenwart von grösseren Mengen Glycerin verhindert die Fällung:

Enzym	Glyceringehalt %					
	0	10	20	30	40	
Essigsäuremutterlauge	100	100	70	33	4	% gefällt
Uranelution	100	55	15	10	0	% gefällt

Durch Alkohol zu 90% kann die Gesamtmenge der Co-Tryptase gefällt werden und wird im Wasserextrakt des Niederschlages gefunden. Sie ist gegen Alkohol recht beständig. Die Reinigung durch Alkoholfällung ist beträchtlich. Bei einigen Versuchen von Waldschmidt-Leitz wurde ein etwa 7 mal grösserer Reinheitsgrad durch diese Operation erreicht.

Die Fällbarkeit der Co-Tryptase durch Uransalze und Tannin beobachtet man auf allen untersuchten Stufen der Reinigung, „auch bei dem reinsten erhaltenen Präparate, das durch aufeinanderfolgende Anwendung der Fällung mit Essigsäure, mit Alkohol und mit Tannin und weiter durch Absorption mit Tonerde und mit Kaolin gewonnen war, liess sich mit diesen Mitteln der grösste Teil der Kinase niederschlagen“.

Sorption.

Mit Tonerde wird die Co-Tryptase glatt sorbiert und kann auf diese Weise von Tryptase getrennt werden. Aus dem durch Essigsäurefällung vorbehandelten Rohauszug geschieht die Sorption am besten bei saurer Reaktion. Zusatz von Alkohol ist günstig. Für die Sorption der mit Alkohol- oder Tanninfällung gereinigten Präparate ist dagegen die neutrale Reaktion am besten. Auch fehlt hier der günstige Einfluss des Alkohols. Die Elution aus den Tonerdesorbaten geschieht mit verdünntem Ammoniak oder mit neutralem oder schwachalkalischem Phosphatgemisch. Die Steigerung des Reinheitsgrades durch die Tonerdesorption ist nicht beträchtlich. Sie ist geringer als die durch Alkoholfällung bewirkte.

Mit Kaolin wird die Co-Tryptase, auch die gereinigte, aus saurer Lösung sorbiert. Alkohol hat keine Wirkung. Elution mit Ammoniak oder glycerinhaltiger alkalischer Phosphatlösung. Steigerung des Reinheitsgrades grösser als mit Tonerde, nicht so gross als mit Alkoholfällung.

Beispiel für die Reinigung.

Aus 250 ccm von überschüssigem Ammoniak befreitem Rohauszug fällte man durch Zusatz von verdünnter Essigsäure Eiweiss usw. möglichst aus. Durch Zusatz von Alkohol zu etwa 90 % wurde dann die Kinase gefällt und dem Niederschlag durch 45 %iges Glycerin entzogen. Nach Verdünnen und Ansäuern mit Essigsäure fällte man mit 2 %iger Tanninlösung einige Begleitstoffe aus, wobei allerdings auch Co-Tryptase mitgefällt wird. So wurden 450 ccm Lösung erhalten (Ausbeute 73 %), die man nach Neutralisieren mit Tonerde sorbierte. Das Sorbat wurde mit Phosphatlösung (pH = 7; 43 % Glycerin) eluiert. (Ausbeute: 62 % von der ursprünglichen Menge.) Die mit Essigsäure angesäuerte Elution behandelte man mit elektroosmotisch gereinigtem Kaolin. Elution mit glycerinhaltigem Ammoniak. Ausbeute 50 % von der in der Ausgangslösung vorhandenen Co-Tryptasemenge. Nach 6½-tägiger Dialyse hatten 182 ccm der Elution ein Trockengewicht von 18,9 mg. Der Reinheitsgrad ist etwa 30 mal grösser als derjenige der Rohlösung.

D. Eigenschaften der Co-Tryptase-Präparate.

Beständigkeit. Durch Erhitzen verliert die Co-Tryptase ihre Wirkung. Neueren Versuchen von Waldschmidt-Leitz ist zu entnehmen, dass bei einstündiger Erhitzung die Zerstörung schon bei 50° recht gross ist, bei 60° verläuft die Inaktivierung sehr schnell. In glycerinhaltiger Lösung ist die Stabilität grösser; bei 60° fand er in einem Versuche eine Zerstörung von 40 % in 50-prozentigem Glycerin.

Die Beständigkeit der Co-Tryptase ist am grössten in etwa neutraler Lösung. Die Zerstörung durch Säure und Alkali nimmt mit steigendem

Reinheitsgrade zu. In folgender Tabelle findet man einen Versuch mit rohem Wasserauszug bei 30°.

Reaktion	Relative Kinasemenge nach Tagen				
	0	1	2	3	4
n/2 essigsauer	100	25	27	6	—
n/5 „	100	19	23	18	—
n/10 „	100	85	53	28	—
n/20 „	100	102	97	75	—
Neutral	100	—	—	99	100
n/20 ammoniakalisch . .	100	100	88	83	79
n/10 „ . .	100	91	69	59	52
n/5 „ . .	100	37	11	—	—
n/2 „ . .	100	18	—	—	—
n „ . .	100	11	—	—	—

Glycerinhaltige Lösungen sind bei gewöhnlicher Temperatur monatelang haltbar[1]. Auch wässerige Lösungen sind bei neutraler Reaktion sehr haltbar.

Durch Fischblasemembran dialysiert die Co-Tryptase nicht[2]. Nach 8tägiger Dialyse gegen destilliertes Wasser fand man noch die ganze Menge Aktivator in dem Schlauch, während das Dialysat unwirksam war.

Die reinsten bisher erhaltenen Präparate enthalten noch Eiweiss. Die Millonreaktion und die Ninhydrinprobe fallen positiv aus, die Kohlehydratprobe nach Molisch dagegen negativ. Mit Pikrinsäure in saurer Lösung wurde keine Trübung beobachtet.

E. Wirkung der Co-Tryptase. Kinetik.

Wie wir oben im Zusammenhang mit der Tryptasewirkung berichtet haben, wissen wir nunmehr nach den Untersuchungen von Willstätter und Waldschmidt-Leitz, dass die Wirkung der Enterokinase (Co-Tryptase) die eines Aktivators ist. Tryptase und Co-Tryptase verbinden sich nach stöchiometrischen Gesetzen zu einem gegen Proteine aktiven Enzymsystem. Auf andere Enzyme als Tryptase hat die Co-Tryptase keine Wirkung. Die Einwirkung der Co-Tryptase zeigt mehrere Besonderheiten und verdient eine eingehendere Beschreibung[3].

1. Zeitlicher Verlauf.

Die Aktivierung des Trypsinogens durch Co-Tryptase erfordert eine gewisse Zeit. Dies wurde schon in den Arbeiten der Pawlowschen Schule[4] gefunden und seitdem durch alle zuverlässigen Untersuchungen bestätigt. Nach Waldschmidt-Leitz[5] führen wir eine Tabelle an:

[1] Vernon, Jl of Physiol. 28, 375; 1902.
[2] Waldschmidt-Leitz, H. 132, 229; 1923/24.
[3] Siehe auch Waldschmidt-Leitz und Harteneck, H. 149, 203; 1925. — Terroine und Kahn-Masino, Arch. Int. Physiol. 26, 69; 1926.
[4] Pawlow, Die Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden 1900.
[5] Waldschmidt-Leitz, H. 132, 207; 1923/24.

Einwirkungszeit Min.	Angewandte Co-Tryptasemenge in ccm				
	0,00	0,02	0,06	0,10	0,20
0	0,11	0,26	0,69	—	1,27
10	—	0,45	0,94	1,08	1,58
30	—	0,56	1,00	1,36	1,69
60	—	0,58	1,01	1,40	1,65
120	0,08	—	1,03	—	—

Nach einer Einwirkungsdauer von etwa 30 Minuten bei 30° ist die Aktivierung beinahe vollständig. Es ist leicht zu sehen, dass die in der Tabelle zum Ausdruck kommende Wirkung unmöglich eine Enzymwirkung sein kann: vielmehr geht hervor, dass jede Menge Co-Tryptase eine bestimmte Menge Tryptase aktivieren kann. Diese von Hamburger und Hekma zuerst, allerdings durch nicht einwandfreie Versuche gefundene Tatsache beweist, dass die Einwirkung der Co-Tryptase in einer Bindung an das inaktive Enzym besteht. Aus den sehr genauen Versuchen von Waldschmidt-Leitz sei noch eine Tabelle angeführt:

Höchstaktivierung bei einer Pankreasprobe.

Kinaselösung ccm	g Trockendrüse		
	0,062	0,125	0,250
0,00	0,42	0,86	1,78
0,01	0,91	1,11	1,92
0,02	1,05	1,32	2,16
0,03	—	1,46	—
0,04	1,02	1,55	2,38
0,05	—	1,56	—
0,06	—	—	2,49
0,08	—	—	2,64
0,10	—	1,55	2,63
0,20	—	1,54	2,66

Die zur Höchstaktivierung eben ausreichende Menge Co-Tryptase ist der Tryptasemenge genau proportional. Aktiviert man eine bestimmte Menge Tryptase mit steigenden Mengen Co-Tryptase, so ist bei nicht allzu grossen Mengen die maximale Aktivierung der Co-Tryptasemenge proportional. Nimmt man sehr grosse Mengen Co-Tryptase, so kann natürlich die enzymatische Tätigkeit schliesslich nicht mehr steigen, wenn alle Tryptase aktiviert ist. Eine Figur aus Waldschmidt-Leitz' Arbeit sei angeführt (Fig. 62).

Einerseits ist nun gezeigt worden, dass die Aktivierung wenigstens bei kleinen Co-Tryptasemengen diesen proportional ansteigt. Daraus will man schliessen, dass die Bindung Enzym Co-Enzym recht vollständig ist. Andererseits hat Waldschmidt-Leitz selbst gezeigt, dass die Verbindung sehr leicht z. B. von Sorptionsmitteln zerlegt werden kann. Es spricht dies dafür,

dass die Dissoziation dieser Verbindung nicht besonders klein ist. Dies stimmt übrigens mit der oben gegebenen Kurve (Fig. 62). Vielleicht sind die Verhältnisse denen ähnlich, die man bei anderen Co-Enzymen, z. B. der

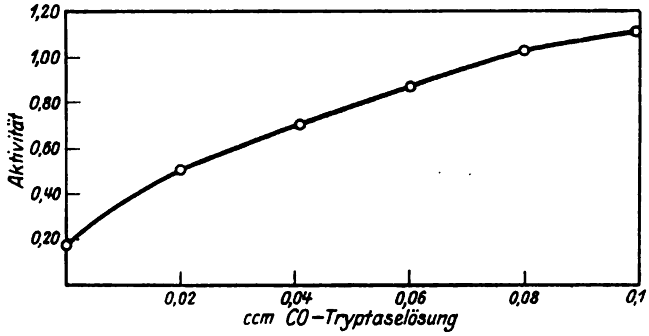


Fig. 62.

Co-Zymase gefunden hat[1]. Dass wirklich eine chemische Bindung und nicht nur etwa eine Sorption zwischen Tryptase und Co-Tryptase eintritt, zeigt u. a. nach Waldschmidt-Leitz der zeitliche Verlauf der Aktivierung. Sorptionen pflegen dagegen momentan zu verlaufen.

2. Aktivierung bei verschiedener Acidität.

Nach Schepowalnikow[2] verläuft die Co-Tryptaseaktivierung am besten in neutraler Lösung, langsamer in saurer oder alkalischer. Diese Angaben sind später von mehreren Autoren bestätigt worden[3]. Eine Tabelle von Waldschmidt-Leitz führen wir an: Wirksamkeit in ccm Lauge angegeben

Einwirkungszeit Min.	pH der Einwirkung		
	5,3	7	8,9
30	0,78	0,96	0,68
60	1,02	0,98	0,69
90	0,98	0,97	0,60

Die Aktivierung verläuft also in saurer Lösung langsamer als in neutraler, erreicht aber denselben Grenzwert. In alkalischer Lösung ist der Grenzwert niedriger, weil hier die Zerstörung der aktivierten Tryptase gross ist.

3. Hemmung der Co-Tryptasewirkung.

Hekma fand, dass Glycerin die Selbstaktivierung der Tryptase verhinderte. Über Hemmungen durch andere Stoffe haben Delezenne[4] sowie

[1] Vgl. Teil I (3. Aufl.), S. 222. — Euler und Myrbäck, H. 136, 109; 1924. — Euler und Nilsson, H. 148, 23; 1925.
[2] Schepowalnikow, Malys Jahresber. 29, 378; 1899.
[3] Vernon, Jl of Physiol. 28, 375; 1902. — Hekma, Jl de Physiol. et Pathol. gén. 6, 25; 1904.
[4] Delezenne, C. R. Soc. Biol. 55, 132; 1903.

Bayliss und Starling[1] berichtet. Starke Hemmung durch Glycerin und noch mehr durch Äthylenglykol fand Waldschmidt-Leitz[2]. Äthylalkohol und Mannit sind dagegen wirkungslos. Die durch Glycerin bedingte Hemmung lässt sich durch eine grössere Co-Tryptasemenge überwinden. Daraus schliesst Waldschmidt-Leitz, dass die Hemmungserscheinungen auf der Bildung von Additionsverbindungen der Kinase mit Alkohol beruhen.

Unbekannte Stoffe in der Drüse hemmen oft die Co-Tryptasewirkung. Daher kommt es, dass die durch eine gewisse Co-Tryptasemenge erhaltene maximale Aktivierung bei verschiedenen Pankreaspräparaten nicht gleich gross ist.

Beispiel[3]: 0,062 g Pankreaspulver, Kinaseauszug mit Wasser auf 2 ccm gebracht.

Aktivitätsangaben in ccm 0,2 n KOH.

Co-Tryptase ccm	Pankreasprobe Nr.		
	VIII	X	XI
0,00	0,00	0,11	0,19
0,02	0,91	0,78	0,78
0,10	1,10 1,13	1,12	1,09

[1] Bayliss und Starling, Jl of Physiol. 32, 129; 1905.
[2] Waldschmidt-Leitz, H. 132, 213; 1923/24.
[3] Waldschmidt-Leitz, ebenda S. 214.

20. Kapitel.

Pepsin.

Das bei stark saurer Reaktion wirksame proteolytische Enzym des Magens ist lange bekannt. Nachdem bewiesen worden war, dass die Verdauungsarbeit des Magens nicht als eine mechanische Wirkung anzusehen ist (Réaumur 1752) und auch nicht einfach auf den Einfluss der Salzsäure zurückgeführt werden kann, wurde erkannt (Spallanzani 1785), dass die durch den Magensaft bewirkte Eiweissspaltung ein Vorgang ist, den wir nunmehr als enzymatisch bezeichnen. Schwann[1] nannte den dabei wirksamen Stoff Pepsin.

Der Magensaft enthält ausser dem Pepsin das sog. Labferment (Chymosin) und eine Lipase. Die sonst im Magensaft gefundenen Enzyme stammen aus verschlucktem Speichel oder zurückgetretenem Darminhalt. Andere proteolytische Wirkungen des Mageninhaltes als die reine Pepsinwirkung sind also entweder der schwachen Wirkung des Labs zuzuschreiben oder evtl. Enzymen, die aus der verletzten Magenwand stammen. In der Magenwand kommen nämlich, wie in allen tierischen Organen, andere Proteasen vor, die z. B. bei der Autolyse deutlich in Wirksamkeit treten.

Das Studium des Pepsins begann eigentlich erst, als die Gewinnung von reinem Magensaft möglich wurde. Die Anlegung einer Dauerfistel an einen Hund gelang Basedow 1842. Verneuil führte die gleiche Operation 1876 am Menschen aus. Verbesserungen in der Operationstechnik und ein genaues Studium des Magensaftes und dessen Absonderung verdanken wir besonders Pawlow und seiner Schule. Vermutlich identisch mit dem Pepsin des Magensaftes ist das Enzym der Brunnerschen Drüsen[2].

Der Magensaft ist eine fast klare, sauere Flüssigkeit. Die freie Säure dürfte ausschliesslich Salzsäure sein. Ihre Menge beträgt 4—6% des Magensaftes. Es sei gleich hier dringend davor gewarnt, einen gewissen Prozentgehalt von Säure als für die Pepsinwirkung optimal anzusehen. In jedem Versuch kann, je nach Art und Menge zugesetzter Stoffe, die Säuremenge verschieden sein, während die Wasserstoffionen-Konzention optimal ist (siehe weiter S. 513 ff.).

[1] Schwann, Über das Wesen der Verdauungsprozesse. Müllers Archiv 1836, 90.

[2] Ponomarew, Zur Physiol. d. Brunnerschen Abt. d. Duodenums. Biochem. Zbl. 1, 351. — Pawlow und Parastschuk, H. 42, 415; 1901.

A. Substrate.

Das Pepsin greift unter keinen Umständen Polypeptide an, auch nicht die sog. Peptone.

Diketopiperazine werden vom Pepsin nicht gespalten[1]. In welchem Grade die bei der Pepsinwirkung anwesende Salzsäure allein eine Veränderung der Diketopiperazine bewirkt, geht aus der von Euler und Pettersson[2] ausgearbeiteten pH-Stabilitätskurve dieser Stoffe hervor.

Die Protamine werden nicht hydrolysiert. So wurde Salmin von Kossel und Mathews[3] untersucht. Die eigentümlichen Resultate von Takemura[4] über die Spaltung von Clupein beruhen auf ungeeigneter Methodik und sind von Rugozinsky[5] mit dem Befund wiederholt worden, dass auch Clupein gegen Pepsin-HCl völlig resistent ist.

Die einfachsten durch Pepsin spaltbaren Stoffe sind Histone (Kossel[6]). Speziell wurden dabei auftretende Spaltprodukte von Felix[7] untersucht (Histopepton, keine Aminosäuren).

Leicht gespalten werden viele der gewöhnlichsten Eiweissstoffe: Casein, Fibrin, Gelatine, Eieralbumin u. dgl.

Hämoglobin wird in Hämatin und Eiweiss zerlegt, das Globin wird dann weiter gespalten.

Aus den leimgebenden Geweben wird der Leim ausgelöst und in Gelatose und Peptone übergeführt.

Echtes Mucin aus der Submaxillardrüse liefert bei der Spaltung Peptone und eine reduzierende Substanz. Andere Mucine werden nicht angegriffen.

Elastin wird langsam gelöst. Aus diesem Grunde ist es als Substrat weniger geeignet.

Nucleoproteide werden äusserst langsam angegriffen[8].

Haarkeratin und Seide werden nicht verändert.

Über Spaltung von phosphorylierten Proteinen haben Neuberg und Oertel Versuche angestellt[9].

Von einer Übersicht über die Chemie der Substrate, wie sie bei der Behandlung anderer Enzyme gegeben wurde, muss hier abgesehen werden, da über diejenigen Gruppen dieser hochmolekularen Stoffe, welche die Angreifbarkeit durch Pepsin bedingen, noch gar keine festen Resultate vorliegen.

Hier sei nun weiter angeführt, dass Pepsin gerade diejenigen Bindungen

[1] Abderhalden und Goto, Fermentf. 7, 169; 1923.

[2] Euler und Erik Pettersson, H. 158, 7; 1926. Levene und Simms, Jl Biol. Chem. 61, 711; 1925.

[3] Kossel und Mathews, H. 25, 190; 1898.

[4] Takemura, H. 63, 201; 1909.

[5] Rugozinsky, H. 79, 398; 1912.

[6] Kossel und Pringle, H. 49, 301; 1906.

[7] Felix, H. 119, 66 u. 120, 94; 1922.

[8] Schittenhelm, Zbl. phys.-path. Stoffw. 5, 49; 1910.

[9] Neuberg und Oertel, Biochem. Zs 60, 506; 1914.

im Eiweissmolekül zu lösen scheint, die nur schwer von den anderen proteolytischen Enzymen angegriffen werden (Trypsin). So macht eine sehr kurze Vorverdauung mit Pepsin viele Eiweissstoffe der Einwirkung des Trypsins sehr viel leichter zugänglich.

Die Wirkung des Pepsins soll die noch nicht genau bekannten Bindungen zwischen den „Grundkörpern" des Eiweisses treffen. So viel ist indessen bekannt, dass durch die Pepsinwirkung Aminostickstoff freigesetzt wird, und zwar bei verschiedenen Substraten etwa dieselbe Menge, 27—39 % vom Totalstickstoff[1]. Auf ungelöste Eiweissstoffe hat das Pepsin eine starke Wirkung, die natürlich unmittelbar ins Auge fällt. Dass nach Abderhalden Pepsin auf gelöste Eiweissstoffe anscheinend keine Wirkung hat, beruht auf dem Umstand, dass der Brechungsexponent der Lösung und die optische Aktivität derselben sich während der Pepsinverdauung nicht oder wenig ändern.

Ob bei der Pepsinverdauung keine strukturell chemischen Änderungen des Substrates bewirkt werden, wie viele Autoren es glauben, ist wohl zum wenigsten zweifelhaft. Es hängt dies mit der Auffassung zusammen, dass die Grundkörper des Eiweisses durch Nebenvalenzen oder sogar nur durch eine physikalische Aggregation zusammenhängen. Abgesehen davon, dass die Einführung von unklaren kolloidchemischen Begriffen, die zu blossen Schlagworten werden, die Enzymchemie kaum gefördert hat, wird durch moderne Untersuchungen immer klarer, dass auch jene Bindungen, ebenso wie die Bindung des Enzyms an Substrat und Reaktionsprodukte, rein chemisch aufzufassen sind.

Auf den Einfluss des physikalischen Zustandes (Aggregatzustandes, Dispersitätsgrades) des Substrates kommen wir unten zurück.

B. Vorkommen des echten Pepsins.

Pepsin kommt im Magen aller untersuchten Vertebraten vor mit Ausnahme von einigen Fischen. Am reichsten an Pepsin ist der Fundusteil des Magens. Das proteolytische Enzym der Brunnerschen Drüsen im Duodenum dürfte echtes Pepsin sein[2]. Wenigstens kommt keine Peptidase vor[3].

(Es ist keine leichte Aufgabe, auf Grund des vorliegenden Tatsachenmaterials eine Entscheidung zu treffen, ob verschiedene, bei saurer Reaktion wirksame Enzyme Pepsine sind. Obgleich durch moderne Untersuchungen klar geworden ist, dass die pH-Kurve nicht ohne weiteres als ein Identitätsmerkmal angesehen werden darf, so soll doch hier bis auf weiteres nur dasjenige proteolytische Enzym Pepsin genannt werden, welches das pH-Optimum bei 1,6—2 hat.)

[1] Henriques und Gjaldbäk, H. 75, 362 und 83, 83; 1913.
[2] R. Schmidt, Weitere Untersuchungen über Fermente im Darminhalt. Dissertation München, 1914.
[3] Abderhalden und Rona, H. 47, 359; 1906.

Bei einigen Tieren kommt das Pepsin schon in den Föten vor, bei anderen fehlt es bei der Geburt. Vom Magen aus kann das Pepsin in verschiedene Körperteile gelangen. Mit dem Mageninhalt wird es in den Darm geführt und findet sich in kleinen Mengen in beinahe dessen ganzer Länge[1], auch bei Föten und Neugeborenen[2]. Da das Pepsin gegen eine selbst sehr schwach alkalische Reaktion sehr empfindlich ist, muss das Vorkommen im Darm dem Umstande zugeschrieben werden, dass es, an Eiweiss gebunden oder sorbiert, eine viel grössere Stabilität besitzt[3]. In den Fäces dürfte es normalerweise nicht vorkommen. In der Milz und den Nieren findet sich kein Pepsin[4], auch nicht in der Leber[5]. Es kommt in sehr geringer Menge im Blut vor, in grösserer Menge im Harn, und zwar sowohl im normalen wie im pathologischen[6]. Das Harnpepsin stammt aus dem Magen, denn bei Hunden tritt es nach Totalexstirpation des Magens nicht auf[7].

Identität der Pepsine verschiedener Tiere.

Die Versuche über diese Frage sind miteinander stark im Widerspruch, in vielen Fällen wegen ungeeigneter Methodik. Besonders ist die Art des Fischpepsins nicht ganz klar. Eine Untersuchung von Rakoczy[8] ergab mehrere Unterschiede zwischen Pepsin vom Hunde und vom Hecht. Das letztere soll einige Eiweissstoffe nur schwer angreifen, die vom Hundepepsin glatt gespalten werden. Weiter soll es ein anderes Aciditätsoptimum und eine geringere Hitzestabilität besitzen. Ähnliche Verhältnisse fanden Oshima und Sasaki[9] bei einer Untersuchung des Pepsins vom Silberlachs (Oncorhynchus kisutch, Walbaum). Sie fanden das Aciditätsoptimum pH = 3,0 (1,6 bei Schweinepepsin). Immerhin besitzen die Fischpepsine ein bedeutend saureres pH-Optimum als die Gewebspepsinasen.

C. Darstellung und Reinigung von Pepsinpräparaten.

Als Ausgangsmaterial nimmt man entweder den Pawlowschen Saft oder Extrakte aus der Magenschleimhaut. Im letzteren Falle kann das Pepsin durch Gewebspepsinasen verunreinigt sein.

Aus Magensaft sind die besten Präparate nach Pekelharing hergestellt

---

[1] Abderhalden und Meyer, H. 74, 67; 1911.

[2] R. Schmidt, Weitere Untersuchungen über Fermente im Darminhalt. Dissertation München, 1914.

[3] Siehe weiter unten die Versuche von Ege.

[4] Hedin, Jl of Biol. Chem. 54, 177; 1922. — H. 122, 307; 1922.

[5] Zachrisson, Upsala läkarefören. förh. 28, 333; 1923.

[6] Hedin, H. 112, 252; 1920.

[7] Matthes, Arch. exp. Path. 49, 107; 1903.

[8] Rakoczy, H. 85, 349; 1913.

[9] Oshima und Sasaki, Jl of the Univ. of Agrik. and Forestry, Sapporo, Japan 16, 307; 1925.

worden[1]. Klarer Magensaft eines Hundes wurde bei 0° dialysiert. Der dabei entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und im Exsiccator getrocknet. In anderen Fällen wurde die Dialyse mehrmals nach Lösen des Niederschlages in verdünnter Salzsäure vorgenommen. Für die nach dieser Methode gewonnenen Präparate geben Nencki und Sieber[2] eine sehr komplizierte Zusammensetzung an; sie halten die Präparate jedoch für das reine Pepsin, was sicher bei weitem nicht zutrifft.

Aus Schleimhautextrakten erhielt Pekelharing nach etwa derselben Methode ungefähr gleich wirksame Präparate wie aus Fistelsaft. Nach Schrumpf kann nach der Buchnerschen Presssaftmethode aus der Schleimhaut ein sehr wirksamer Saft gewonnen werden. Durch Sorption an Cholesterin (siehe weiter unten) erhielt Schrumpf verhältnismässig gute Präparate[3]. Sehr wirksames Pepsin, das in vielen Fällen die Pekelharingschen Präparate übertrifft, gewann Hammarsten[4] durch Fällen mit NaCl von Extrakt aus Schleimhaut.

Die Pepsinpräparate sind in Glycerin löslich. Das rohe Enzym kann auch mit diesem Lösungsmittel aus der Magenwand extrahiert werden. Die Glycerinlösungen des Enzyms, die wie gewöhnlich sehr haltbar sind, können mit Alkohol gefällt werden, wobei das Pepsin in den Niederschlag geht.

Die analytische Zusammensetzung der besten bisher gewonnenen Präparate ist natürlich durch die sicher in grossen Mengen anwesenden Verunreinigungen völlig entstellt. Die Präparate von Nencki und Sieber enthalten ein Nucleoproteid, ausserdem Fe und Cl. Indessen können nach den Pekelharingschen Methoden Präparate gewonnen werden, die frei von P und Cl sind und einen sehr geringen Aschengehalt aufweisen[5]. Eiweissfreie Pepsinpräparate sind von Sundberg[6] und Schrumpf hergestellt worden. Die Pekelharingschen Präparate haben einen relativ hohen Schwefelgehalt (über 1,5%).

Pepsin dialysiert nicht durch gewöhnliche Membrane[7].

Sorption.

Wie bei vielen anderen Enzymen dürfte auch hier zu erwarten sein, dass die Sorptionsmethoden bei der Pepsinreinigung gute Dienste leisten werden. Noch ist darüber recht wenig gearbeitet.

[1] Pekelharing, H. 22, 233; 1896/97. — Ringer, H. 75, 282; 1911.
[2] Nencki und Sieber, H. 32, 291; 1901.
[3] Schrumpf, Hofm. Beitr. 6, 396; 1905.
[4] O. Hammarsten, H. 108, 243; 1919 und 121, 240 und 261; 1922.
[5] Pekelharing, H. 35, 8; 1902 und 75, 282; 1911. — Ringer, H. 95, 195; 1915. — Dezani, Arch. Ital. Biol. 54, 15; 1911.
[6] Sundberg, H. 9, 319; 1865.
[7] Hammarsten, Malys Jahrb. 3, 160.

Pepsin wird sehr leicht von verschiedenen Stoffen sorbiert[1]. Nimmt man an, dass die pH-Kurve des Enzyms durch die elektrochemischen Eigenschaften desselben wenigstens teilweise bestimmt wird, so ist es erklärlich, dass das Enzym am leichtesten von basischen Sorbentien aufgenommen wird. Schon Brücke[2] fand, dass Pepsin leicht von allerhand ausfallenden Niederschlägen mitgerissen wird. Die Sorption an Cholesterin ist zur Reinigung des Pepsins angewandt worden. Dabei wird die rohe Enzymlösung mit kleinen Mengen einer ätherischen Lösung von Cholesterin geschüttelt; die ausgefällten Cholesterinflocken werden abfiltriert und das Sorbat mit Äther zersetzt. Das Sorbat ist selbst wenig wirksam[3], d. h. Gruppen, die für die enzymatische Spaltung notwendig sind, werden bei der Sorption beansprucht.

An Fibrinflocken wird in schwach saurer Lösung das Pepsin gebunden und kann wieder durch verdünnte Sodalösung abgelöst werden[4]. Auch an andere feste Eiweissstoffe wird es leicht gebunden (Elastin: Abderhalden[5]). Möglicherweise kann diese Sorption in der Reinigungsarbeit Verwendung finden. Eine Sorption an einem ausfallenden Niederschlag ist wohl auch die Fällung des Pepsins aus roher Lösung mit Safranin (Marston[6]).

Tierkohle sorbiert bei pH = 1—2, Phosphate und Citrate eluieren bei pH = 6,8 bzw. 5,0 (K. Kikawa).

Eine nicht erwünschte Sorption des Pepsins an Stoffen des Mageninhaltes tritt oft, besonders bei abnorm kleinem Säuregehalt des Magensaftes, ein. Eine gründliche Untersuchung über diesbezügliche Bindung des Enzyms ist von Ege[7] ausgeführt. Er zeigt, dass die Sorption stark von der Acidität abhängig und vollkommen reversibel ist. (In dieser Untersuchung auch interessante Notizen über Pepsin- und Salzsäuretherapie.)

Pepsin wird von Tonerde leicht gebunden. Die Angabe von Rakusin[8], dass die Bindung irreversibel ist, verdient wohl Nachprüfung.

D. Kinetik.

1. Einfluss der Enzymmenge.

Die zur Erklärung der enzymatischen Wirksamkeit nunmehr allgemein angenommene Theorie über die Bindung zwischen Enzym und Substrat wird in diesem Falle durch folgende Formel ausgedrückt:

$$\frac{[\text{freies Pepsin}] \times [\text{Substrat}]}{[\text{Enzym-Substratverbindung}]} = K.$$

[1] Michaelis und Ehrenreich, Biochem. Zs 10, 292, 1908.
[2] Vorlesg. über Physiol. 1, 291; 1874.
[3] Dörle, Zs exp. Med. 34, 406; 1923.
[4] Jacoby, Arch. exp. Path. 2, 247; 1906.
[5] Abderhalden und Strauch, H. 71, 315; 1911. — Abderhalden und Friedel, H. 71, 449; 1911.
[6] Marston, Biochem. Jl 17, 851; 1923.
[7] Ege, Ugeskrift for Laeger, Nr. 38, 1922.
[8] Rakusin, Jl russ. phys.-chem. Ges. 47, 141; 1915 und 47, 1055; 1915 nach Chem. Zbl.

Die Konzentration der Moleküle der Enzym-Substratverbindung bestimmt die Geschwindigkeit der Reaktion. Da nun sicher hier wie bei allen Enzymreaktionen die Konzentration des Enzyms gegen die des Substrates zu vernachlässigen ist, so folgt, dass bei gleichbleibender Substratkonzentration die Reaktionsgeschwindigkeit der Enzymmenge direkt proportional sein muss. Es wird betont, dass man beim Studium dieser Frage von der obigen Grundgleichung ausgehen soll und nicht umgekehrt auf den Resultaten von Versuchen mit unreinem Enzym, unreinem Substrat und mangelhafter Methodik komplizierte Theorien aufbauen. Zeigt es sich, dass trotz sorgfältiger Ausführung der Versuche nach einer einwandfreien Methodik Abweichungen von dem Proportionalitätsgesetz vorhanden sind, so ist dies auf äussere Einflüsse zurückzuführen, auf Enzymzerstörung, auf Einwirkung von unbekannten Hemmungskörpern, Giften u. dgl. Hier bietet gerade die Pepsinwirkung ein lehrreiches Beispiel:

Durch Studium der Pepsinverdauung wurde nämlich E. Schütz[1] zu seiner bekannten Regel geführt, die seitdem der Anlass zu einer enormen Menge Arbeiten auf allen Gebieten der Enzymchemie gewesen ist, die aber sehr wenig zu einer klaren Auffassung der wirklichen Verhältnisse beigetragen hat.

Nach Schütz ist, wenn F die Enzymmenge und x die nach einer bestimmten Zeit umgesetzte Menge bedeutet,

$$x = k\sqrt{F}.$$

Diese Gleichung sagt also, dass die Reaktionsgeschwindigkeit (anfangs) der Quadratwurzel aus der Enzymmenge direkt proportional ist.

Eine grosse Zahl von Versuchen, welche die Schützsche Regel scheinbar stützen, sind mit einer solchen Methodik angestellt worden, dass man überhaupt keine Schlüsse ziehen darf.

Aber neben diesen trifft man auch solche Untersuchungen, in denen nach einwandfreier Methode eine annähernde Übereinstimmung gefunden wurde. Bemerkenswert sind die grundlegenden Untersuchungen von Sjöqvist[2]. Methodisch sind sie deshalb wichtig, weil hier zum erstenmal die Leitfähigkeit als Mass der Geschwindigkeit gewählt wurde. Als Substrat nahm Sjöqvist salzfreies Ovalbumin.

Eine gewisse Klärung der Verhältnisse verdanken wir Northrop. Er konnte erstens zeigen, dass für einige, besonders reine Pepsinlösungen eine völlige Proportionalität zwischen Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge herrschte[3].

Die Methode gründete sich auf die Bestimmung der elektrischen Leitfähigkeit nach Sjöqvist[4]. Es wurde im Beginn der Reaktion, wo die

---

[1] E. Schütz, H. 9, 577; 1885. — J. H. Schütz, H. 30, 1; 1900.
[2] Sjöqvist, Skand. Arch. Physiol. 5, 317; 1895.
[3] Northrop, Jl of Gen. Physiol. 2, 113; 1919.
[4] Sjöqvist, Skand. Arch. Physiol. 5, 277; 1895.

Spaltung der Zeit proportional ist, die Zeit bestimmt, die bei verschiedenen Pepsinmengen zu einer bestimmten kleinen Umsetzung nötig war. Wir führen folgende Tabelle an[1]:

Zugesetzte Enzymmenge	Beobachtete Zeit (Min.) Vers. 1	Vers. 2	Berechnete relative Enzymmenge (Mittel)
100	6,0	8,1	(100)
50	11,8	14,4	53
25	22,4	32,0	26
12,5	44,0	—	13,6

Weiter fand nun Northrop bei anderen Pepsinpräparaten keine Proportionalität, sondern die relative Aktivität war bei grösseren Enzymmengen kleiner[2]. In der Fig. 63 sind zwei Versuchsreihen veranschaulicht.

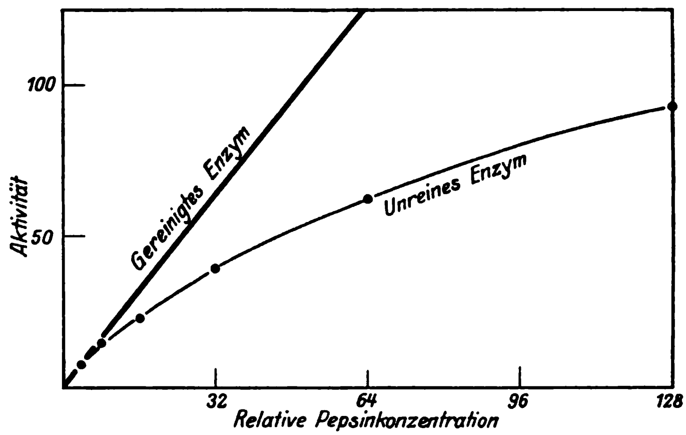


Fig. 63.

Dieses Verhalten der unreineren Enzymlösung führt Northrop auf die Anwesenheit eines Stoffes zurück, der mit dem Pepsin eine dissoziierende Verbindung bildet. In undissoziiertem Zustande ist diese Verbindung enzymatisch inaktiv. Dieser hypothetische Stoff wäre den bei anderen Enzymen bekannten Hemmungskörpern analog. Die einfache Erklärung Northrops wurde durch eine mathematische Behandlung gestützt, und dadurch bewiesen, dass es gelang, durch Zusätze von bestimmten Stoffen (von Northrop Peptone genannt) zu der reinen Pepsinlösung ein gleichartiges Verhalten hervorzurufen. Die Hemmungsstoffe werden wahrscheinlich durch das Enzym aus den in der unreinen Lösung vorkommenden Eiweisstoffen gebildet, und die ganze Erscheinung wird also auf die bekannte Hemmung durch die Reaktionsprodukte zurückgeführt.

Eine endgültige Aufklärung der Kinetik der Pepsinwirkung setzt natürlich

[1] Zu genau demselben Resultat kamen später Rona und Kleinmann, Biochem. Zs 140, 478; 1923.

[2] Northrop, Jl Gen. Physiol. II, 471; 1920.

die Einsicht in die Natur des vom Pepsin ausgelösten chemischen Vorganges voraus, über den bis jetzt noch die verschiedensten Ansichten bestehen (vgl. hierzu auch das 16. Kapitel). Es ist zu hoffen, dass die Untersuchung der Spaltung der einfachsten, von Pepsin angreifbaren Stoffe hier wichtige Schlüsse erlauben wird. Wie bei der Tryptase- und Erepsinspaltung des Clupeins hat Waldschmidt-Leitz in neuester Zeit bei der Spaltung der Histone durch Pepsin und andere Proteasen die Verteilung der enzymatisch lösbaren Bindungen auf die einzelnen Enzyme untersucht, was natürlich in hohem Grade zur Klärung sowohl der Konstitution der spaltbaren Stoffe wie der Wirkungsweise der Enzyme beitragen wird.

Temperaturkoeffizient der Pepsinspaltung. Herzog[1] hat nach der Mettschen Methode die Konstante Q der Formel

$$k_2 = k_1 \cdot e^{\frac{Q(T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 \cdot T_2}}$$

bestimmt. In folgender Tabelle bedeutet k die Reaktionskonstante.

t	14°	19,4°	25,2°	28,9°	35,8°
k gef.	0,95	(2,14)	3,67	(4,9)	7,7
k ber.	1,35	2,14	3,42	4,9	7,70

Aus den eingeklammerten Werten findet man $Q = 15\,000$.

Im Temperaturintervall 30° bis 40° fanden Rona und Kleinmann[2] den Temperaturkoeffizienten 1,9.

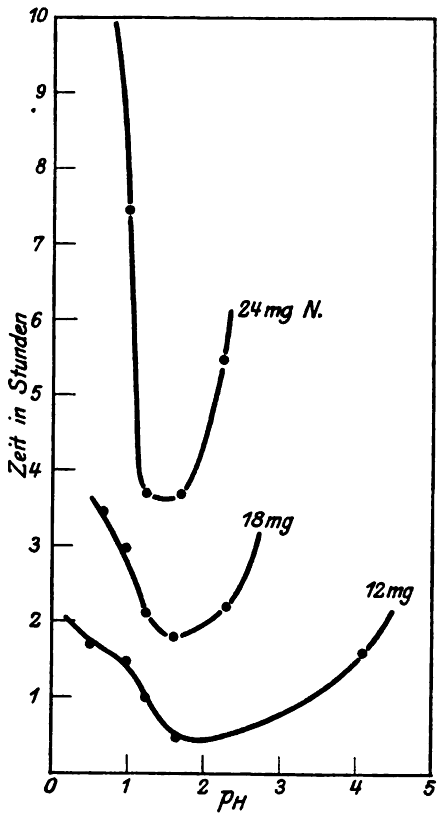


Fig. 64.

2. Aktivitäts-pH-Kurve.

Sehr früh wurde die Bedeutung der sauren Reaktion für die Pepsinwirkung erkannt. Man nahm eine Verbindung Pepsin-HCl an oder glaubte wenigstens, dass die Anionen für die Säurewirkung massgebend seien. Durch die klassischen Untersuchungen von Sörensen über die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration für die Geschwindigkeit der Fermentreaktionen erschien auch die Pepsinwirkung im neuen Lichte. Die erste pH-Kurve stammt von Sörensen[3]. Seine Methode war die Bestimmung der

---

[1] Herzog, Zs f. allg. Physiol. 4, 163; 1904.
[2] Rona und Kleinmann, Biochem. Zs 159, 146; 1925.
[3] Sörensen, Biochem. Zs 21, 288; 1909.

nach verschiedenen Zeiten durch Gerbsäure bzw. Stannochlorid fällbaren Menge Stickstoff. In Fig. 64 fasst Sörensen seine Resultate zusammen. Bei längeren Versuchszeiten verschiebt sich das Optimum gegen die saure Seite. Dies dürfte auf der bei wechselnden Aciditäten verschiedenen Kinetik beruhen, nicht auf Enzymzerstörung, wie Sörensen annahm.

Weitere Versuche über den Einfluss von verschiedenen Säuren und Salzen haben Michaelis und Mendelsohn[1] ausgeführt: Substrate waren Edestin und Casein. Salzsäure, Salpetersäure, Weinsäure und Oxalsäure gaben dasselbe Optimum bei pH = 1,7. Salze, die die Acidität nicht ändern, verschieben das Optimum nur sehr unbedeutend gegen die weniger saure Seite[2].

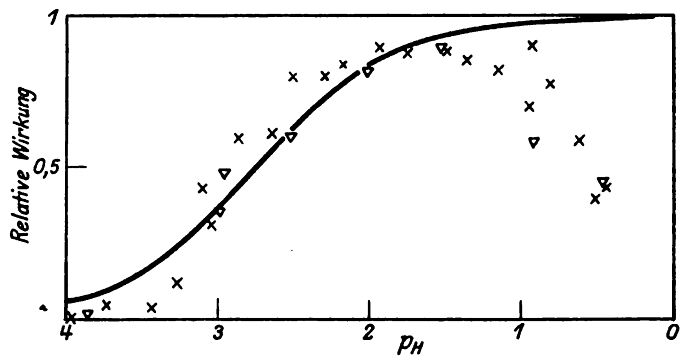


Fig. 65.

× Versuche mit Edestin. △ Versuche mit Casein. Ausgezogene Kurve = theoretische Dissoziationskurve.

Michaelis führt nach dem Vorgange von J. Loeb[3] die Kurve auf eine Dissoziationskurve zurück, und zwar nimmt er auf Grund von Überführungsversuchen[4] an, dass die Kationen des Pepsins wirksam sind[5]. Nunmehr wissen wir, dass Überführungsversuche an unreinen Enzymlösungen oft gar nichts über den wahren elektrochemischen Charakter des Enzyms aussagen; da es ferner nach dem Folgenden vermutlich gerade die Eiweisskationen sind, die vom Enzym gebunden und gespalten werden, so ist es, wenn man überhaupt eine Bindung des Enzyms an das Substrat annimmt, wahrscheinlicher, dass die Anionen des Pepsins wirksam sind. Dies ist in guter Übereinstimmung mit den Überführungsversuchen von Pekelharing und Ringer[6], die fanden, dass gereinigtes Pepsin in saurer Lösung immer als Anion vorhanden ist.

[1] Michaelis und Mendelsohn, Biochem. Zs 65, 1; 1914.
[2] Über die Puffer bei pH-Bestimmungen in Pepsinlösungen siehe Smorodinzew und Adolf, Bull. Soc. Chim. Biol. 7, 1060; 1925.
[3] J. Loeb, Biochem. Zs 19, 534; 1909.
[4] Michaelis und Davidsohn, Biochem. Zs 28, 1; 1910.
[5] Michaelis und Mendelsohn, Biochem. Zs 65, 1; 1914.
[6] Pekelharing und Ringer, H. 75, 282; 1911.

Es sei hervorgehoben, dass die pH-Kurve gewiss auch durch andere Theorien gedeutet werden kann. Es ist natürlich überhaupt nicht notwendig, sich die Bindung Enzym-Substrat als eine Salzbildung vorzustellen. Bei manchen Enzymreaktionen ist dies sicher gar nicht der Fall und auch hier sind andere Bindungsarten denkbar. Auch bei den proteolytischen Enzymen wird sich wahrscheinlich die Annahme von der mehrfachen Bindung des Substrates ans Enzym[1] für das Verständnis der enzymatischen Wirkung als nützlich erweisen.

In den oben zitierten Versuchen von Michaelis fällt es auf, dass das pH-Optimum für die beiden Substrate dasselbe ist. Dies ist auffallend, da

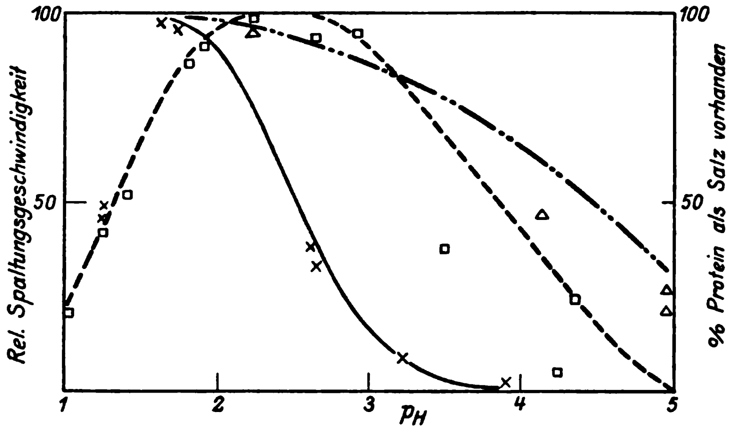


Fig. 66.

Casein ———— × × × Gelatin — — — □□□ Hämoglobin — ·· — ···· △△△

nach Northrop die pH-Kurve mit dem Substrat variiert[2]. Die verschiedenen Befunde hängen wahrscheinlich mit den angewendeten Bestimmungsmethoden zusammen. Nachdem Euler[3] und später Arrhenius[4] in mehreren Arbeiten den Gedanken zum Ausdruck gebracht hatten, dass die Einwirkung der Acidität auf die enzymatische Proteolyse mehr als eine Wirkung auf das Substrat als auf das Enzym aufzufassen sei, konnte Northrop in mehreren Arbeiten zeigen, dass die pH-Kurven der Pepsinverdauung der verschiedenen Substrate recht gut mit den Ionisationskurven derselben zusammenfallen. Die Spaltung wurde nach der Sörensenschen Formolmethode und van Slykes HNO_2-Methode verfolgt und die Ionisation durch Leitfähigkeitsmessungen bestimmt. In Fig. 66 stellen die Kurven die Ionisation der Proteine dar. Die Punkte geben die relativen Spaltungsgeschwindigkeiten an.

Bei Casein ist die Übereinstimmung sehr gut, weniger bei Hämoglobin, schlecht bei Gelatine. Immerhin ist es, auch wenn die Northropsche

[1] Euler, H. 143, 79; 1925.
[2] Northrop, Jl Gen. Physiol. 5, 263; 1922.
[3] Euler, H. 51, 218; 1907.
[4] Quantitative laws in biological chemistry, London 1915.

Theorie eine zu einfache Verallgemeinerung ist, klar, dass die Aciditätskurve des Pepsins mit den elelektrochemischen Eigenschaften des Substrates variiert. Als sicher dürften wir annehmen können, dass die pH-Kurve nicht wie in der ursprünglichen Theorie von Michaelis nur von dem Dissoziationszustand des Enzyms abhängt. Am wahrscheinlichsten ist wohl der schon in der Literatur zum Ausdruck gekommene Gedanke, dass sowohl die Salzbildung des Substrates wie die des Enzyms (und möglicherweise noch andere Faktoren) die Aktivitätskurve des Pepsins bestimmen. Besondere Beachtung fordern die Eigenschaften der Enzymsubstratverbindung, denn obgleich die Salzbildung von Enzym und Substrat wahrscheinlich die Bildung der Enzymsubstratverbindung beeinflussen, so sind doch die Eigenschaften dieser Verbindung für deren Zerfallsgeschwindigkeit bestimmend. (Northrop hat seine Annahme, dass sich das Pepsin nicht mit dem Substrat kombiniere, wieder verlassen.)

Aus der nach Drucklegung dieser Darstellung erschienenen wichtigen Arbeit von Waldschmidt-Leitz und E. Simons (H. 156, 114) können wir nurmehr kurz erwähnen, dass das Verhältnis NH_2 : COOH bei der Pepsinspaltung nahe konstant = 1 gefunden wurde.

3. Physikalischer Zustand des Substrates.

Eine Streitfrage ist, wie der physikalische Zustand des Substrates die Enzymwirkung beeinflusst. Nach der alten Theorie zur Erklärung des Einflusses der Säure auf die Pepsinwirkung sollte die Säure die Eiweissstoffe durch Quellung vorbereiten und dadurch erst die Spaltung ermöglichen. Diese Ansicht geht sogar auf Brücke[1] zurück, und wurde in neuerer Zeit wieder von Wo. Ostwald aufgenommen[2]. Nur schwer lassen sich indessen Tatsachen ausfindig machen, die dafür sprechen, dass die „Hydratation" oder „Quellung" bei der enzymatischen Eiweissspaltung von Wichtigkeit ist[3]. Vielmehr sprechen auch hier die modernen Untersuchungen eher gegen als für eine wesentliche Bedeutung des sog. kolloiden Zustandes auf die Reaktionsfähigkeit von eiweissartigen Substraten. So ist z. B. durch die Untersuchungen von Loeb[4] bekannt, dass die Quellung, der osmotische Druck, die Viscosität usw. in hohem Grade davon abhängt, ob die zur Einstellung der Acidität zugesetzte Säure oder Base monovalent oder bivalent ist. Dagegen ist der chemische Effekt (die Salzbildung) der verschiedenen Säuren derselbe. Aus schon zitierten Untersuchungen[5] folgt indessen, dass bei der Pepsinspaltung die Natur der zugesetzten Säure belanglos ist. Speziell hat

[1] Brücke, Sitzungsber. Akad. Wissensch. Math.-naturw. 36, 131; 1859.
[2] Wo. Ostwald, Koll. Zs 30, 248; 1922.
[3] Interessant wäre in dieser Hinsicht eine nähere Untersuchung der von Felix beschriebenen Histonspaltung durch Pepsin (Verh. Deutsch. Physiol. Ges. Rostock 1925).
[4] J. Loeb, Proteins and the theory of colloidal behavior. New York 1922.
[5] Michaelis und Mendelsohn, l. c.

Northrop[1] nun, wie folgende Figur veranschaulicht, gezeigt, dass Salzsäure und Schwefelsäure bei derselben Acidität genau dieselbe Pepsinspaltung bewirken, obgleich der physikalische Zustand des Substrates in diesen beiden Fällen höchst verschieden ist.

Nunmehr ist festgestellt worden, dass alle Säuren (möglicherweise Essigsäure ausgenommen[2]) dasselbe pH-Optimum geben. Besonders interessant ist hier die Untersuchung von Guyemant[3] über das diesbezügliche Verhalten der Sulfosalicylsäure. Diese Säure kann unter keinen Umständen das Eiweiss durch Quellung vorbereiten. Vielmehr ist es eines der besten Fällungsmittel für Eiweiss. Versuche mit Sulfosalicylsäure, bei denen das Substrat also

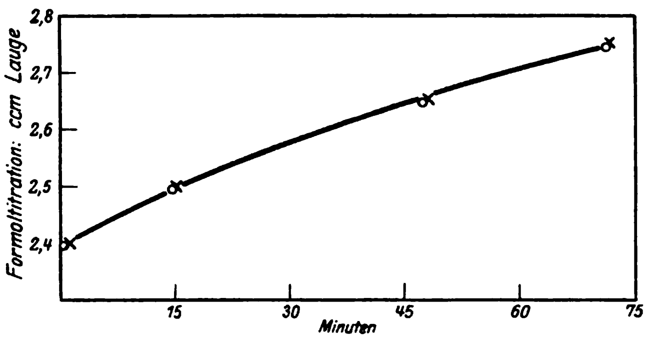


Fig. 67.

so gut wie vollständig ausgefällt war, ergaben genau dasselbe Optimum wie Salzsäure. Dagegen ist in diesem Falle, wie leicht zu verstehen, die absolute Geschwindigkeit etwas herabgesetzt, wenn die ganze Substratmenge in fester Form vorhanden ist.

Die Frage, wie sich das Pepsin zu festen Substraten verhält, verdient noch einige Worte: Es ist bekannt, dass feste Eiweissstoffe (koaguliertes Albumin u. dergl.), die von der Salzsäure allein nicht angegriffen werden, von Pepsin-Salzsäure leicht gelöst werden. Es ist sogar oft beobachtet worden, dass die Spaltungsgeschwindigkeit eines festen Substrates beinahe ebenso gross ist wie die desselben Substrates in gelöstem Zustande. Auf der Verwendung von festem Substrat beruhen viele der älteren Methoden zur Pepsinbestimmung (Mettsche Probe u. a.). Immerhin muss man beachten, dass die Verwendung eines festen Substrates die schon ohnedies genügend unklaren Verhältnisse bei der Eiweissverdauung noch verwickelter macht und deren Zurückführung auf bekannte chemische Gesetze erschwert. Damit ist natürlich nicht gesagt, dass das Studium der Lösung der festen Eiweissstoffe nicht, z. B. für die Physiologie, von grosser Bedeutung sein kann.

[1] Northrop, Jl Gen. Physiol. 5, 263; 1922.
[2] Northrop, Jl Gen. Physiol. 1, 607; 1919.
[3] Guyemant, Biochem. Zs 20, 105, 155; 1920.

Möglicherweise können solche Versuche auch dazu beitragen, die unbekannten Veränderungen der Eiweissstoffe, z. B. bei der Hitzekoagulation, zu klären.

4. Einfluss der Konzentration des gelösten Substrates.

Zuerst seien einige Versuchsreihen von Northrop angeführt[1]: Substrat: Eieralbumin. Die Anfangsgeschwindigkeit durch Leitfähigkeitsmessungen ermittelt. Zwei Versuchsreihen mit verschiedenen Enzympräparaten. Kurve I: pH = 1,80, Kurve II: pH = 1,60.

Wir sehen aus der Figur 68, dass die Geschwindigkeit anfangs etwa proportional der Substratkonzentration ansteigt, um später relativ kleiner zu werden. Schliesslich wird ein Maximum erreicht, was der vollständigen Bindung des Enzyms entspricht. (In sehr konzentrierten, viscösen Lösungen fällt die Reaktionsgeschwindigkeit wieder ab, was vermutlich mit der verringerten Diffusionsgeschwindigkeit zusammenhängt.)

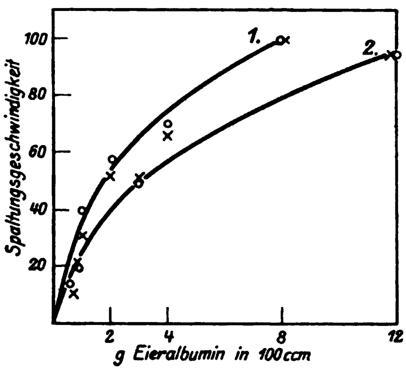


Fig. 68.

In recht guter Übereinstimmung mit diesen Versuchen stehen diejenigen von Rona und Kleinmann[2]. Hier wurde das unveränderte Substrat bestimmt (nephelometrische Methode). Leider geben die Verfasser nur die relativen Substratkonzentrationen an. Aus vielen Versuchsreihen sieht man indessen, dass die Spaltungsgeschwindigkeiten, die anfangs der Substratkonzentration annähernd proportional sind, mit steigender Substratmenge immer langsamer zunehmen, um einem Maximum zuzustreben.

Scheinbar in völligem Widerspruch damit stehen dagegen die Versuche von Herzog und Margolis[3]. Substrat war auch hier Ovalbumin. Die Spaltung wurde durch Wägen des nach verschiedenen Zeiten noch hitzekoagulierbaren Eiweisses bestimmt. Wir führen eine Tabelle an:

Substratkonzentration g Ovalbumin in 100 ccm	g Ovalbumin fällbar	Nicht fällbar = Umgesetzte Menge	Reaktionsgeschwindigkeit Monomol. Konstante
0,092	0,051	0.041	0,256
0,185	0,147	0,038	0,100
0,277	0,236	0,041	0,070
0,370	0,332	0.038	0.047
0,462	0,432	0,030	0,029

[1] Northrop, Jl of gen. Physiol. 2, 595; 1920.

[2] Rona und Kleinmann, Biochem. Zs 140, 461, 478; 150, 444; 155, 39; 1924. — 159, 146; 1925.

[3] R. O. Herzog und Margolis, H. 60, 298; 1909.

Nach diesen Versuchen wären im Anfang der Reaktion die umgesetzten Mengen etwa gleich. Dies entspricht in der Figur einer wagerechten Geraden. Versuchen wir nun die Ursache dieser schlechten Übereinstimmung zwischen den Northropschen Versuchen und denen von Herzog und Margolis zu finden, so ist zu bemerken, dass die Bestimmungsmethoden ganz verschieden sind. Abgesehen davon, dass die Methoden mehr oder weniger genau arbeiten können, so bestimmt man im einen Falle die Reaktionsprodukte, im zweiten das unveränderte Substrat. In diesem Fall betrifft die Messung also die erste Phase des Pepsinabbaues, der, wie wohl anzunehmen ist, in mehreren Stufen verläuft. Die Geschwindigkeit jeder Reaktionsstufe wird unter anderem von der Affinität des Enzymes zu dem zu spaltenden Stoffe bestimmt. Ist die Affinität des Pepsins zum Ovalbumin, wie auch aus anderen Gründen wahrscheinlich ist, sehr hoch, so erklärt dies die Resultate von Herzog und Margolis. Ist dagegen die Affinität des Enzyms zu einem der ersten Abbauprodukte verhältnismässig klein, so wird die Spaltungsgeschwindigkeit dieses Stoffes mit der Substratkonzentration rasch ansteigen, wie Northrop in seinen Versuchen fand. Wie dem auch sei, so dürften die verschiedenen Bestimmungsmethoden nach dem oben Gesagten eine einigermassen getrennte Untersuchung einiger Reaktionsstufen des Pepsinabbaues erlauben.

Ein interessantes Beispiel für die ausschlaggebende Bedeutung der Bestimmungsmethode bieten einige Versuchsreihen von Rona und Kleinmann[1]. Sie untersuchten die Eiweissspaltung nephelometrisch und fanden mit dieser Methode keine Hemmung durch Eiweissspaltprodukte, sei es, dass diese enzymatisch oder durch Säurehydrolyse gewonnen waren.

5. Salzwirkungen.

Von den älteren Arbeiten sind nur wenige von Wert, da der Einfluss der Salze von dem der Acidität nicht getrennt wurde. In den meisten Fällen, auch in neueren Arbeiten, ist die behauptete Wirkung der sog. Neutralsalze nichts als eine Verschiebung der Acidität zu einem nicht optimalen, und was schlimmer ist, nicht gemessenen Wert.

In grossen Konzentrationen hemmen wie gewöhnlich alle Salze. Dagegen ist, wo eine einwandfreie Methodik zur Anwendung gekommen ist, nie eine Aktivierung beobachtet worden, welche über den bei optimaler Acidität ohne Salz gefundenen Wert hinausging. Dagegen können bei nicht optimaler Acidität geringe Aktivierungen durch Salze eintreten. (Die Abhängigkeit der Aktivierung eines Enzyms durch ein Salz von der Acidität tritt in neueren Untersuchungen über tierische Amylasen deutlich hervor.) Nach Michaelis und Mendelsohn[2] und besonders nach einer späteren

[1] Rona und Kleinmann, Biochem. Zs 159, 146; 1925.
[2] Michaelis und Mendelsohn, Biochem. Zs 65, 1; 1914.

Untersuchung von Rona und Kleinmann[1] bewirken die Neutralsalze eine kleine Verschiebung der pH-Kurve gegen die weniger saure Seite. Untersucht wurden die gewöhnlichen Ionen K, Na, Ca, Al, Cl, NO_3, SO_4.

6. Zeitlicher Verlauf.

Die Mehrzahl der alten Versuche sind wie gewöhnlich nach einer solchen Methodik angestellt, dass sie nur wenig über den wahren Verlauf der Pepsinspaltung aussagen.

In neueren Arbeiten ist oft ein angenäherter Anschluss an die Schützsche Regel gefunden worden:

$$x = k \cdot \sqrt{t}$$

($x =$ die zur Zeit t umgesetzte Menge des Substrates; k eine Konstante).

Wichtige Arbeiten verdanken wir hier Sjöqvist[2], die von Arrhenius später rechnerisch behandelt wurden. Hier kam die Leitfähigkeitsbestimmung zur Anwendung; nach Northrop liefert diese Methode Resultate, welche den nach der Formolmethode gewonnenen nicht parallel sind, für vergleichende Versuche ist sie aber doch gut geeignet.

Zu beachten ist, dass jede Bestimmungsmethode, auch wenn sie analytisch einwandfrei ist, einen ganz verschiedenen Reaktionsverlauf geben kann, je nachdem man das unangegriffene Eiweiss oder eines der Reaktionsprodukte bestimmt. Ehe wir über die allgemeine Wirkung der proteolytischen Enzyme besser unterrichtet sind, ist die Aufstellung komplizierter Formeln für den Reaktionsverlauf ohne Wert. So viel dürften wir indessen sagen können: Die in jedem Zeitmoment der enzymatischen Reaktion beobachtete Geschwindigkeit $\left(\frac{dx}{dt}\right)$ ist proportional mit der zu dieser Zeit anwesenden Menge der Enzymsubstratverbindung. Diese Grösse hängt nun ausser von der Wasserstoffionenkonzentration auch von der Anwesenheit enzymbindender, aber nicht spaltbarer Körper ab. Schon in rohen Pepsinlösungen kommen solche Stoffe vor, und durch die enzymatische Wirkung entstehen sie in grossen Konzentrationen. Mit verschiedenen Substraten wird man daher verschiedenen Reaktionsverlauf beobachten.

Die mit der nephelometrischen Methode von Rona und Kleinmann[3] ausgeführte Untersuchung über die Pepsinspaltung des Serumalbumins ergab z. B. dass der Verlauf der Reaktion sich befriedigend durch die Formel der bimolekularen Reaktion darstellen liess.

Zeitlicher Verlauf der Sekretion des Pepsins. Durch eine grosse Reihe ausserordentlich wichtiger und interessanter Versuche aus dem

[1] Rona und Kleinmann, Biochem. Zs 150, 444; 1924.
[2] Sjöqvist, Skand. Arch. Physiol. 5, 317; 1895.
[3] Rona und Kleinmann, Biochem. Zs 159, 146; 1925.

Institut für experimentelle Medizin in Petersburg, besonders von London[1], wurde festgestellt, wie sich der zeitliche Verlauf der Sekretion des Pepsins im Magensaft nach Reiz durch die per fistulam eingeführte Eiweissnahrung (Fleisch usw.) gestaltet. Diese grundlegenden Versuche erfordern eine eingehende Besprechung und werden — da sie ein besonderes biologisches Kapitel bilden — im III. Teil dieses Werkes behandelt.

E. Hemmungserscheinungen.

Anorganische Stoffe.

Tsuchihashi[2] untersuchte die Wirkung von Metallpulvern auf rohe Pepsinlösung. Nach einer bestimmten Einwirkungszeit wurde das Metallpulver abzentrifugiert und die Lösung geprüft. Bei diesen Versuchen kann die Wirkung der Metalle ausser auf Komplex- bzw. Salzbildung des Enzyms mit in Lösung gegangenem Metall auch auf einer Sorption des Enzyms an der Metalloberfläche beruhen. Kupfer und Zink schädigten stark, Kobalt und Eisen schwächer, Nickel gar nicht. Eine Regeneration des Kupfer-vergifteten Enzyms mit Glykokoll gelang nicht. Dies ist nichts Eigentümliches, wenn man bedenkt, dass eine Bildung von Glykokollkupfer bei pH = etwa 1,5 wenig wahrscheinlich ist.

Versucht man, solche Hemmungen durch Metallionen nach modernen Gesichtspunkten zu bearbeiten, so wird dies dadurch erschwert, dass sowohl Substrat als Reaktionsprodukte Metalle stark binden. Dass indessen auch sehr kleine Mengen Metallsalz inaktivieren können, hat Hata gezeigt[3]. Eine Regeneration nach Quecksilbervergiftung gelang ihm nicht, was auch er auf die stark saure Reaktion zurückführt.

Auch von Arbeiten über sog. Vergiftungen mit anorganischen Stoffen ist eine grosse Anzahl theoretisch nicht benutzbar, da die Acidität nicht berücksichtigt worden ist. Die älteren Resultate von Smorodinzew und Riabouschinsky[4] über die Einwirkung von Arseniat, Tartrat usw. (Anwendung des alkalischen Salzes Na_2HAsO_4!) haben diese Forscher durch Aciditätsmessungen ergänzt.

Fluoride, deren Wirkung physiologisch von Interesse sein kann, hemmen in mässigen Konzentrationen nicht (Vandevelde und Poppe[5]).

$NaHSO_3$ hemmt nicht, was nach einer Mitteilung von Elisabeth Rona, die in mancher Hinsicht die Kritik herausfordert, darauf hindeuten soll, dass im Pepsinmolekül keine Aldehydgruppe vorhanden ist[6]. Die Entscheidung

[1] E. S. London, H. 45, 381; 1905. — 49, 359; 1906. — 56, 394; 1908. — 60, 194; 1909.
[2] Tsuchihashi, Biochem. Zs 140, 149; 1923.
[3] Hata, Biochem. Zs 17, 159; 1909.
[4] Smorodinzew und Riabouschinsky, Biochem. Zs 144, 26; 1923. — 168, 73; 1925.
[5] Vandevelde und Poppe, Biochem. Zs 28, 134; 1910.
[6] Elisabeth Rona, Biochem. Zs 109, 282; 1920. — Es sei hierzu bemerkt, dass nicht alle Arten von Aldehyden Sulfit addieren. Auch Elisabeth Ronas Versuche mit Hydroxylamin dürften bis jetzt die Abwesenheit einer Aldehydgruppe nicht beweisen.

über die Gegenwart dieser und anderer Gruppen in einem Enzymmolekül auf Grund von Giftwirkungen verlangt allerdings noch weitere, vielseitigere Untersuchungen unter Variation der Versuchsbedingungen.

Organische Stoffe.

Kleine Mengen Toluol und Chloroform sind unschädlich; grössere sollen hemmen (Astruc und Renaud[1], Grober[2]). Wo ungelöstes Toluol usw. vorkommt, kann eine Hemmung durch Sorption an der Grenzfläche eintreten.

Äthylalkohol hemmt stark in grösseren Mengen (20% Haneborg[3]). Höhere aliphatische Alkohole sind wirkungslos. Benzylalkohol hemmt stark[4].

Formaldehyd wirkt ungewöhnlich schwach: 24 stündige Einwirkung von 10% Formaldehyd schädigt nicht (Johannessohn[5]). Allerdings kann hier eine Schutzwirkung von Verunreinigungen der Enzymlösung vorhanden sein.

In den meisten Fällen kann auch hier eine Aciditätsänderung beim Zusatz des Giftes die Ursache der beobachteten Hemmung sein. In den sehr vielen Versuchen, wo sowohl Aktivierungen wie Hemmungen durch denselben Stoff beobachtet worden sind, ist dies im allgemeinen der Fall. Für die Chemie des Pepsins sind solche Untersuchungen wertlos, dagegen können sie für die Physiologie vielleicht von Bedeutung sein, da es ja hier gleichgültig ist, ob eine schädliche Verzögerung der Pepsinverdauung auf Aciditätsänderung oder auf spezifische Giftwirkung eines Stoffes beruht.

Über die Wirksamkeit des Pepsins in adsorbiertem Zustand siehe S. 510; ferner Kikawa (Jl of Biochem. 6, 275; 1926).

F. Bestimmung der Wirksamkeit.

Es ist zuerst notwendig, ein Substrat zu finden, das leicht rein und in grossen Mengen gewonnen werden kann, und das eine genaue Bestimmung der Spaltung erlaubt. In diesen Hinsichten dürfte Gelatine anwendbar sein wie es Willstätter bei Arbeiten über Trypsin fand[6]. Die Bestimmung der Spaltung dürfte in diesem Falle am besten nach einer Methode geschehen, durch welche der Zuwachs des freien Aminostickstoffs oder Carboxyls gemessen wird. Die Bestimmung der Spaltung wird im Anfang der Reaktion vorgenommen, um die Einwirkung der Spaltprodukte möglichst auszuschalten, und die Anfangsgeschwindigkeit wird durch eine (wenigstens für den ersten Teil der Reaktion) gültige Reaktionskonstante ausgedrückt. Mit hinreichender Genauigkeit dürfte man mit der monomolekularen Konstante rechnen können.

[1] Astruc und Renaud, Jl de Pharm. et de Chim. 25, 81; 1922.
[2] Grober, Pflüg. Arch. 104, 109; 1904.
[3] Haneborg, Acta med. Scand. Suppl. 1, 1; 1921.
[4] Jacobson, Soc. Biol. 83, 1054; 1919.
[5] Johannessohn, Biochem. Zs 83, 28; 1917.
[6] Siehe z. B. Willstätter und Persiel, H. 142, 245; 1925.

Nun ist nach Northrop bei kleinen Substratkonzentrationen die Geschwindigkeit (umgesetzte Menge pro Zeiteinheit) der Substratkonzentration annähernd proportional. In diesem Gebiete ist also die monomolekulare Konstante von der Substratkonzentration unabhängig und kann als Mass der Enzymmenge dienen. Als Ausdruck für den Reinheitsgrad finden wir dann:

$$Pf_{Gel.} = \frac{k}{g\ \text{Präparat}}.$$

Eine passende Temperatur ist dann festzulegen. Die Messung von k geschieht bei optimaler Wasserstoffionenkonzentration und, falls die Enzymlösung unrein ist und Hemmungskörper enthält, bei einer so kleinen Enzymkonzentration, dass Proportionalität zwischen derselben und k herrscht.

Die oben definierte Grösse Pf ist (als Spezialfall von $\dot{X}f$) nach dem Vorbilde von den schon lange angewendeten Ausdrücken If, Sf usw. gebildet[1]; nur muss hier, wie bei allen Enzymen, die mehrere Substrate spalten, auch das Substrat mit in die Definition einbezogen werden.

G. Die Stabilität des Pepsins.

Zur Erklärung der pH-Kurve des Pepsins ist oft die Möglichkeit erwogen worden, dass eine geringe Stabilität des Enzyms eine verringerte Reaktionsgeschwindigkeit vortäuschen kann. Sörensen glaubte z. B., dass dies die

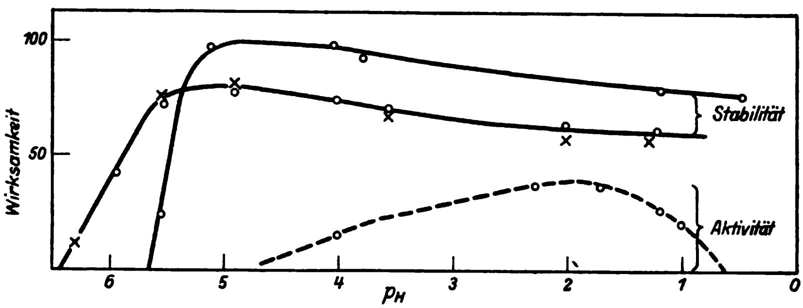


Fig. 69.

Ursache der Verschiebung des Optimums während der Reaktionszeit sei[2]. (Diese Verschiebung kann wohl eher durch die wechselnde Kinetik bei verschiedenen Aciditäten erklärt werden.) Die Abnahme der Spaltungsgeschwindigkeit in stark saurer Lösung führt Arrhenius auch auf eine Zerstörung des Enzymes zurück[3]. Unter den Versuchen, die Stabilität des Enzymes zu bestimmen, leiden die älteren wie gewöhnlich an der Nichtberücksichtigung der Acidität. Untersuchungen mit moderner Methodik haben Northrop

[1] Vgl. I. Teil (3. Aufl.), S. 17.
[2] Sörensen, Bioch. Zs 21, 288; 1909.
[3] Quantitative laws in biological chemistry, London 44, 1915.

sowie Michaelis und Rothstein[1] ausgeführt. Northrop stellte folgendes fest:

Verschiedene Säuren (HCl, H_2SO_4, HNO_3, H_3PO_4, $H_2C_2O_4$) haben denselben Einfluss auf die Stabilität des Pepsins.

Die Reinheit der Enzymlösung war von keiner Bedeutung. Dies gilt vielleicht nur für Lösungen mit geringem Reinheitsgrad.

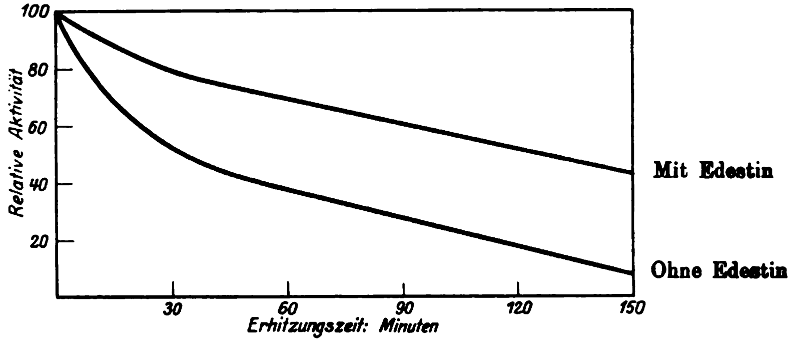


Fig. 70.

Die Enzymzerstörung kann die pH-Kurve nicht erklären.

Die Stabilitäts-pH-Kurve zeigt keine Ähnlichkeit mit der Aktivitäts-pH-Kurve. Einige Versuche sind in Fig. 69 zusammengefasst, gültig für 38°.

Pepsin und Lab werden durch OH′ parallel zerstört (Michaelis und Rothstein[1]).

Neue Versuche von Ege[2] haben viele interessante Ergebnisse erbracht: Erstens ist eine deutliche schützende Wirkung des Substrates vorhanden. In

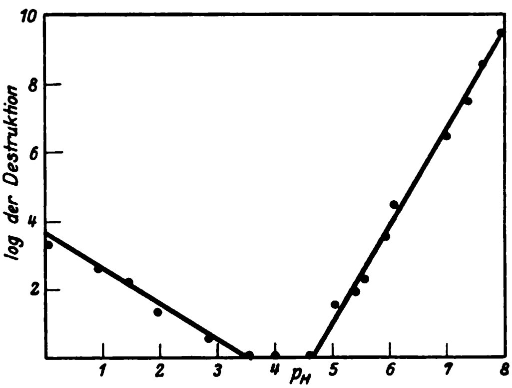


Fig. 71.

Figur 70 sind die Inaktivierungskurven des Pepsins mit und ohne 0,2% Edestin bei pH 1,6 (Weinsäure) und 55° gezeichnet.

[1] Northrop, Jl Gen. Physiol. 2, 465; 1920. — Michaelis und Rothstein, Biochem. Zs 105, 60; 1920.

[2] Ege, H. 143, 159; 1925.

Ege stellt weiter fest, dass der zeitliche Verlauf der Zerstörung anfangs geradlinig ist. Bestimmt man in diesem Teil der Kurve die Zerstörungsgeschwindigkeit bei verschiedener Acidität, so erhält man die Kurve in Fig. 71: Destruktion = Anzahl $g \cdot 10^{-6}$ Armour-Pepsin während einer Stunde zerstört, bei einer Anfangskonzentration von etwa 0,1% A.-P.

Was die Deutung der Kurve betrifft, so betont Ege zunächst, dass die Annahme von Michaelis und Rothstein über den Einfluss der Hydroxylionen nicht zutrifft. Diese Autoren hatten angenommen, dass die Zerstörung im neutralen und alkalischen Gebiete mit steigender Temperatur nur durch die Vergrösserung der OH-Ionenkonzentration mit der Temperatur bedingt sei. Ege weist darauf hin, dass das Stabilitätsoptimum recht nahe mit dem Optimum der Sorption des Pepsins an Eiweiss zusammenfällt. Da man auch aus anderen Gründen annehmen muss, dass das Pepsin in käuflichen Präparaten oft mit einem Stoff vergesellschaftet ist, durch den es gebunden wird, so kann dieser Umstand die Stabilitätskurve und die Abweichungen zwischen den Versuchen von Ege und den von Northrop wenigstens teilweise erklären. Versuche mit hochgereinigtem Pepsin müssen die Entscheidung bringen.

Ultraviolette Strahlen inaktivieren (Hussey und W. R. Thompson, Jl Gen. Physiol. 9, 217; 1925).

H. Synthetische Wirkungen des Pepsins.

Es ist eine sehr alte Beobachtung, dass in konzentrierten Lösungen von Eiweissabbauprodukten die proteolytischen Enzyme unter Umständen eine Bildung von höhermolekularen Stoffen hervorrufen können. Dieser Vorgang, den man oft an der Bildung eines Niederschlages erkennt, wird Plasteinbildung genannt (vgl. I. Teil, 3. Aufl. S. 321). Ob die Plasteinbildung als eine eigentliche Reversion der proteolytischen Spaltung anzusehen ist, ist wohl sehr zweifelhaft, und dasselbe gilt wohl von den früheren Versuchen Robertsons[1].

Zuerst sei hervorgehoben, dass die Bildung eines Niederschlages ein sekundärer Prozess ist, der nur dadurch bedingt ist, dass mitunter einige der durch die Synthese entstandenen Stoffe wasserunlöslich sind. Die grundlegende Feststellung, dass eine Synthese wirklich eintritt, verdanken wir Henriques und Gjaldbäk[2], die zeigen konnten, dass die Plasteinbildung von einer Abnahme des Formol-titrierbaren Stickstoffes begleitet ist. Hierdurch wird die Deutung von Bayliss[3], es handle sich um eine einfache (!) kolloidchemische Ausflockung, unmöglich. Sehr wichtig ist nun, dass nach Henriques and Gjaldbäk die Plasteine in gewissen Fällen nicht mehr

[1] T. B. Robertson, Jl Biol. Chem. 8, 287; 1910. — Robertson und Biddle, Jl Biol. Chem. 9, 295; 1911.

[2] Henriques und Gjaldbäk, H. 71, 485; 1911 und 81, 439; 1912.

[3] Bayliss, Jl of Physiol. 46, 236; 1913.

Formolstickstoff enthalten als die genuinen Proteine. Übrigens scheinen sie weniger Totalstickstoff zu haben[1].

Die Fähigkeit zur Erzeugung der Plasteine besitzen wahrscheinlich alle Proteasen, auch solche aus Pflanzen, Hefen und Bakterien[2].

Dass eine Enzymwirkung wirklich stattfindet, wird durch folgende Tatsachen gestützt:

a) Nur sehr kleine Enzymmengen sind notwendig[3].

b) Inaktiviertes Enzym gibt keine Plasteine.

Die Reaktion soll reversibel sein und von der Acidität in charakteristischer Weise abhängen[3]. Auch die Steigerung der Plasteinbildung mit zunehmender Temperatur haben Borsook und Wasteneys untersucht.

Wie man auch die Plasteinbildung deuten will, sicher ist, dass die gewonnenen Niederschläge keine wirklichen Eiweisstoffe sind[4], wohl aber dürfte es möglich sein, dass die Reaktion eine Umkehrung einzelner Stufen des enzymatischen Eiweissabbaues ist.

Über das Verhalten der Plasteine im Tierkörper siehe Knaffl-Lenz und Pick, Arch. f. exp. Path. u. Pharm. 71, 296 u. 407; 1913.

---

[1] H. Bayer, Hofm. Beitr. 4, 554; 1904.

[2] Rakoczy, H. 75, 273; 1911. — Kämmerer, Zs Immun. 6, 235; 1911.

[3] Wasteneys und Borsook, Jl Biol. Chem. 62; 15, 633, 675; 1924/1925. — 63, 563; 1925.

[4] Lawrow und Salaskin, H. 36; 277; 1902. — Levene und van Slyke, Biochem. Zs 13, 458; 1908 und 16, 203; 1909.

21. Kapitel.

Die übrigen Proteasen der mehrzelligen Tiere.

A. Autolyse von Organen.

Wenn nach dem Tode eines Tieres ein beliebiges Organ herausgenommen und unter Fernhalten von Bakterien sich selbst überlassen wird, tritt mit der Zeit ein weitgehender Zerfall der Gewebe ein. Hierbei sind vor allem proteolytische Enzyme wirksam. Diese stammen nicht aus dem Pankreas auch nicht aus dem Blute[1]. Es zeigt sich also, dass die Gewebe selbst proteolytische Enzyme enthalten. Sofern wir wissen, enthalten alle Zellen, tierische und pflanzliche, Proteasen, die während des Lebens der Zelle durch irgendeinen Mechanismus gesteuert werden, die aber nach dem Tode der Zelle ihre volle Wirksamkeit entfalten und eine Selbstverdauung, „Autolyse", hervorrufen. Aus diesem Umstande, dass die Organproteasen erst nach dem Tode in wahrnehmbare Tätigkeit treten, darf man natürlich nicht den Schluss ziehen, dass sie in der lebenden Zelle unwirksam sind. Vielmehr dürften sie das Enzymsystem ausmachen, wodurch die Zelle ihren Eiweissumsatz, den Aufbau des Zelleiweisses und die Spaltung und Verwertung desselben, vollziehen kann. In welcher Weise nun die lebende Zelle die Synthese und die Spaltung regelt, ist eine Frage, die jetzt noch gar nicht beantwortet werden kann. Die Aufrechthaltung einer passenden Acidität ist hier natürlich von Bedeutung; aber ausserdem spielen wohl besondere Hemmungskörper mit.

Schon 1855 fand Cloetta[2] in der Lunge Leucin. Umfangreiche Untersuchungen wurden später von Salkowski[3] angestellt. Er fand, dass nach Aufbewahren der Organe in Chloroformwasser Tyrosin und Leucin isoliert werden konnten, welche in den frischen Organen nicht vorkommen. In zellfreien Extrakten erhielt Schwiening eine Autolyse, was also für die enzymatische Natur des Vorgangs ein Beweis ist[4].

Bei der Autolyse entstehen Aminosäuren und höhere Spaltungsprodukte der Proteine. Dazu kommen auch Ammoniak und Harnstoff. Möglich ist,

---

[1] Matthes, Arch. exp. Pathol. 51, 442; 1904. — Oker-Blom, Skand. Arch. Physiol. 14, 48; 1903.

[2] Cloetta, Jl prakt. Chem. 66, 211; 1855.

[3] Salkowski, Zs klin. Med. 17, 79; 1891. — Die deutsche Klinik 11, 147; 1903.

[4] Schwiening, Virchows Arch. 136, 444; 1895.

dass dies auf einer Desamidase bzw. Arginase beruht; die Verhältnisse sind indessen gar nicht geklärt.

Es ist noch nicht möglich zu sagen, wieviele Proteasen in den tierischen Zellen vorhanden sind. Auch wissen wir nicht, ob einige der Organproteasen mit den oben beschriebenen proteolytischen Enzymen, Pepsin und Trypsin, identisch sind. Ziemlich sicher dürfte es indessen sein, dass kein eigentliches Pepsin in den Geweben vorkommt. Das bei stark saurer Reaktion, pH = etwa 2, wirksame Pepsin dürfte nur im Magen der höheren Tiere existieren. Dagegen ist es wohl möglich, dass unter den Organproteasen trypsinartige Enzyme zu finden sind, welche mit der eigentlichen Pankreastryptase möglicherweise identisch sind. Sicher ist aber, dass, wenigstens in einigen Fällen, Proteasen mit dem Aciditätsoptimum bei pH = 4—5 vorkommen und wahrscheinlich ist, dass solche Enzyme die Hauptmenge der Organproteasen ausmachen. Die Unterscheidung mehrerer Enzyme in dem Gemisch der Organproteasen ist nunmehr in mehreren Fällen gelungen, und die ersten derartigen Abgrenzungen machten Hedin und Dernby.

Durch Untersuchungen von Salkowski, E. Fischer, Kossel und anderen wurde festgestellt, dass durch die Autolyse Aminosäuren und höhere Spaltprodukte der Proteine gebildet werden. Über die Wirkungsweise der Enzyme dagegen widersprechen sich die Befunde zum Teil in hohem Grad. Schwiening[1] und Biondi[2] fanden, dass Alkali die Autolyse verhinderte, während ein Säurezusatz günstig wirkte.

Die Anwesenheit von Proteasen im Buchnerschen Presssaft aus tierischen Geweben zeigten Hedin und Rowland[3]. Sie fanden auch, dass die Geschwindigkeit der Autolyse in alkalischer Lösung herabgesetzt wurde und am besten in 0,25% Essigsäure verlief. In einer folgenden Untersuchung[4] unterscheidet Hedin zwischen α-Protease, die in alkalischer Lösung optimal wirkt, und β-Protease, die in saurer Lösung ihre beste Wirkung ausübt. Behandelt man das Gewebe zuerst mit sehr verdünnter Säure, und führt es dann in alkalische Lösung über, so verläuft nach Hedin die Autolyse viel schneller, als wenn man das Gewebe unmittelbar in dieselbe alkalische Lösung bringt. Dies erklärt Hedin damit, dass Hemmungskörper vorkommen, welche in saurer Lösung zerstört werden. Nach Dernby dagegen beruht dies Verhalten darauf, dass in saurer Lösung zuerst eine schwache Vorverdauung durch das peptische Enzym geschieht, wodurch die Substrate dann viel leichter von dem tryptischen Enzym angegriffen werden. Dies ist in voller Übereinstimmung mit den bei Magenpepsin und Pankreastrypsin gefundenen Verhältnissen.

[1] Schwiening, Virchows Arch. pathol. Anat. 136, 444; 1894.
[2] Biondi, Virchows Arch. pathol. Anat. 144, 373; 1896.
[3] Hedin und Rowland, H. 32, 531; 1901.
[4] Hedin, Upsala Läkarefören. Förh. 11, 1906, Suppl.

Nachdem Vines[1] die Anwesenheit von mehreren Proteasen in den höheren Pflanzen vermutet hatte, machte Dernby durch Versuche mit Gelatine- und Peptonspaltung wahrscheinlich, dass die proteolytischen Wirkungen der Hefe und der tierischen Gewebe[2] auf mehreren Enzymen beruht. In Leber, Milz, Pankreas, Magenschleimhaut und in Leukocyten fand er also eine Pepsinase und eine Tryptase. Dazu kommt dann die Peptidase[3]. In einigen Geweben soll nun eins der Enzyme in sehr grosser Menge vorkommen können und dadurch die Wirkung der anderen Enzyme verdecken.

Die Pepsinase hat nach Dernby ihre optimale Wirkung bei pH = 3 — 3,5, die Tryptase und die Peptidase bei pH = 7,5 — 8. Die optimale Acidität

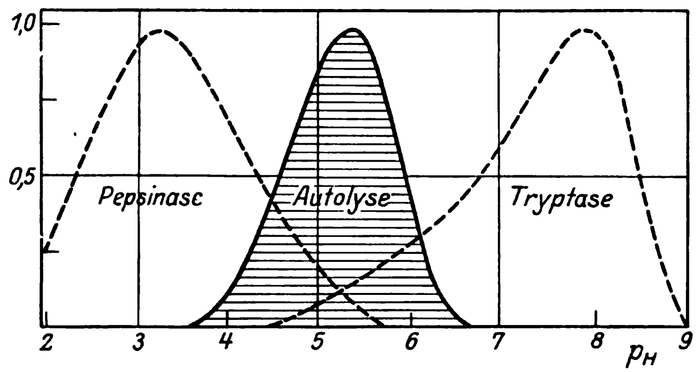


Fig. 72.

der Autolyse setzt sich nun aus diesen drei Aciditätskurven zusammen. Wir führen eine Figur nach Dernby an (Fig. 72).

Dernby schliesst nun, dass, wenn man die Anwesenheit der drei Enzyme und ihre Aciditätsabhängigkeit berücksichtigt, alle weitere Annahmen von Antienzymen usw. überflüssig sind.

Es geht aus mehreren Untersuchungen hervor, dass in gewissen Geweben die Pepsinase oder die Tryptase fehlen kann.

Die Annahme von Bradley[4], es gebe in den Geweben nur eine einzige echte Protease mit einem pH-Optimum 3—7 ist nach seinen Versuchen nicht berechtigt, wäre aber in qualitativer Übereinstimmung mit den unten zu besprechenden Befunden von Willstätter über die Hefenprotease.

Durchaus unbeantwortet ist die Frage über die Spezifität der Organproteasen. In vielen Arbeiten wird nämlich behauptet, dass die Proteasen eines Organs nur die zelleigenen Proteine angreifen. Wenn es möglich ist, dass die eigenen Proteine besonders leicht angegriffen werden, und dies kann wohl mit der Gegenwart von aktivierenden und hemmenden Stoffen

[1] Vines, Ann. of Bot. 18, 289; 1904.
[2] Dernby, Jl Biol. Chem. 35, 179; 1918.
[3] Über die Peptidasewirkung der verschiedenen Organe siehe Kap. 16, S. 401 u. 17, S. 432.
[4] Bradley, Jl Biol. Chem. 52, 467; 1922.

zusammenhängen, so wissen wir indessen auch, dass wenigstens einige besonders leicht verdauliche fremde Proteine (Casein, Fibrin) immer gespalten werden.

Proteasen der Leber.

Am besten bekannt sind die Leberproteasen und die meisten Versuche über Autolyse sind mit Leber angestellt. Bei Versuchen mit Leber studierte Salkowski bekanntlich zuerst die Autolyse[1]. Die Enzyme sind schwer von den Zellen zu trennen. So fanden Levene und auch Dernby, dass Extrakte, die nach Reiben des Gewebes mit Sand dargestellt werden, gegen

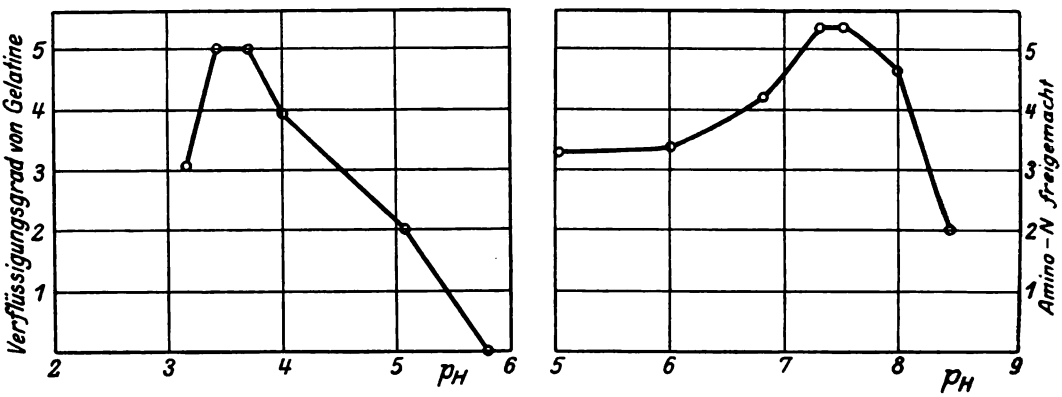


Fig. 73.

Gelatine und Pepton unwirksam waren. Wird dagegen eine Suspension von Leberzellen angewandt, so tritt Spaltung ein. Dies wurde zuerst von Smith[2] beobachtet.

Die pH-Kurven stellte dann Dernby[3] fest. In Figur 73 sind seine Resultate veranschaulicht.

Gelatine wird also nur in saurer Lösung von der Leberpepsinase verflüssigt. In alkalischer und sehr schwach saurer Lösung spaltet die Lebertryptase Peptone. Diese Wirkung der zwei Enzyme zeigt sich auch bei der Autolyse der Leber.

pH	mg Amino-N nach 20 Stunden bei 37°	pH	mg Amino-N nach 20 Stunden bei 37°
3,1	0,69	6,8	1,43
4,0	2,52	7,4	1,75
5,0	3,86	7,9	1,86
6,1	2,35	8,4	0,23

[1] Salkowski, Zs klin. Med. 17, Suppl. 77; 1890.
[2] Smith, N. Y. Med. Jl 60, 590; 1894.
[3] Dernby, Jl Biol. Chem. 35, 179; 1918.

In einem Versuch wurde untersucht, wie sich der Stickstoff zwischen den entstandenen Reaktionsprodukten verteilt.

pH		N im Filtrat nach 72 Stunden bei 37°			
vor	nach	Total	Protein	Peptid	Amine
4,2	4,0	177	9,0	63,0	64,5
7,6	7,0	132	24,0	0,0	51,8

In saurer Lösung ist also viel Peptidstickstoff vorhanden, in alkalischer Lösung keiner, weil hier die Tryptase schneller wirkt.

Später haben Rona und Mislowitzer[1] die Leberautolyse studiert. Sie fanden das pH-Optimum bei 3,6—3,8. Ein zweites Optimum fanden sie nicht. Sie wollen daraus schliessen, dass nur ein pepsinähnliches Enzym bei der Leberautolyse wirksam ist, was auch in Übereinstimmung mit Willstätters Untersuchungen über Hefenprotease wäre.

Der Umstand, dass die Kinetik der gesamten Proteasenwirkung stark mit der Acidität wechselt, kann indessen nicht als ein Beweis dafür angesehen werden, dass mehrere Proteasen teilnehmen. Es scheint ausserdem, als wäre die Methode der Gelatineverflüssigung nicht ganz einwandfrei, und es ist wohl möglich, dass auch in der Leber nur eine Protease mit dem Optimum bei schwach saurer Reaktion vorhanden ist.

Zachrisson[2] fand in autolysierter Rinderleber Caseinspaltung bei pH = etwa 5 am schnellsten. Die Peptonspaltung hatte zwei pH-Maxima bei etwa 4 und 7. Zachrisson vermutet, dass das Optimum bei neutraler Reaktion von der Wirkung des Erepsins herrühre; dies ist nunmehr nach Waldschmidt-Leitz' Untersuchungen unwahrscheinlich. Ein Enzym, das auf Casein am besten in alkalischer Lösung wirkt, fand Zachrisson nicht. Ein saures Optimum, aber auch starke Eiweissspaltung in schwach alkalischer Lösung fanden Steppuhn und Utkin-Ljubowzoff[3]. Auch Bradley[4] fand in der Leber zwei proteolytische Enzyme: ein in saurer Lösung wirksames und eines, das höhere Spaltprodukte in alkalischer Lösung weiter spaltet.

Abweichende Resultate der einzelnen Verfasser können darauf beruhen, dass Lebern von verschiedenen Tieren die Enzyme in relativ verschiedener Menge enthalten.

Wie bei den anderen proteolytischen Enzymen sind die pH-Kurven wohl auch hier von den Eigenschaften sowohl des Enzyms als des Substrates abhängig. Ob die Pepsinase die Eiweisskationen, wie Bradley[4] und Sevringhaus[5]

[1] Rona und Mislowitzer, Biochem. Zs 140, 517; 1923.
[2] Zachrisson, Upsala läkareför. Förh. 28, 333; 1923.
[3] Steppuhn und Utkin-Ljubowzoff, Biochem. Zs 150, 165; 1924 und 158, 38; 1925.
[4] Bradley, Jl Biol. Chem. 52, 467; 1922.
[5] Sevringhaus, Jl Biol. Chem. 57, 181; 1923.

annehmen, angreifen, ist zweifelhaft. Wahrscheinlicher ist wohl, dass von diesen Enzymen das undissoziierte Eiweiss gespalten wird.

Von den älteren Versuchen über den Einfluss von Salzen usw. auf die Wirkung dieser Proteasen sind die meisten wertlos, da auf pH-Verschiebungen

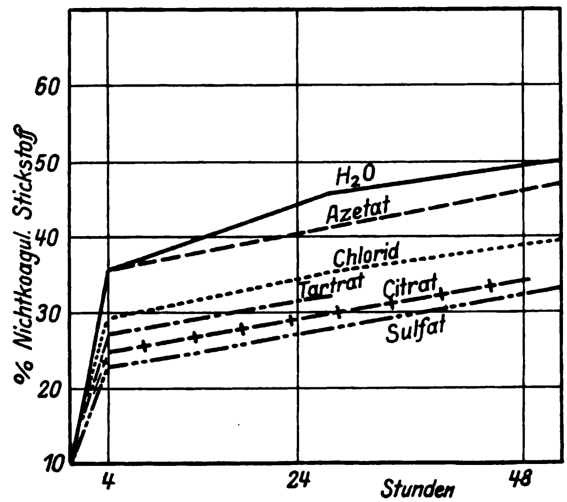


Fig. 74a.

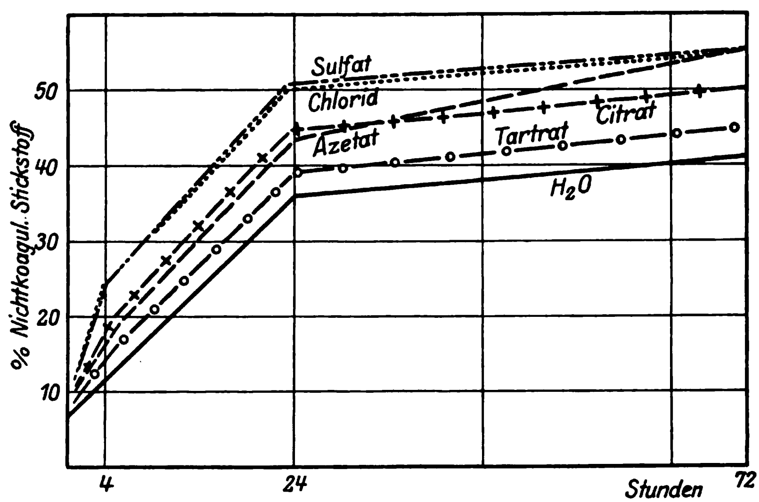


Fig. 74b.

keine Rücksicht genommen wurde. Neue Versuche verdanken wir Rona[1], und zwar betreffen sie die Leberpepsinase. Es wurde zuerst festgestellt, dass das pH-Optimum vom angewandten Puffer abhängig ist. So wurde gefunden, dass Weinsäure und Milchsäure ein Optimum bei etwa 3,7 gaben, Phtalat-

[1] Rona und Mislowitzer, Biochem. Zs 140, 517; 1923 und 146, 1; 1924.

puffer dagegen bei etwa 4,2. Die Einwirkung der Neutralsalze wurde danach untersucht. Es ergab sich, dass die Einwirkung je nach der Acidität verschieden war. So hemmten die Anionen der Chloride, Sulfate und Citrate bei pH = 3,6 deutlich. Stark hemmten auch unter denselben Bedingungen Tartrat und Bromid, das Acetat war wirkungslos. Wurden indessen dieselben Salze bei pH = 5—6 untersucht, so wurde statt der Hemmung eine deutliche Förderung beobachtet. Wir führen als Beispiel zwei Figuren, 74 a und b, an.

Von den Kationen wurden K, Na und Ca untersucht. Bei optimaler Reaktion hemmen die Chloride dieser Metalle in grösseren Konzentrationen, in kleineren fördern sie. Natrium hemmt mehr, bzw. fördert weniger als Kalium. Abseits von dem Optimum ist auch hier eine Umkehr der Wirkung zu beobachten. Die Natriumkurve liegt über der Kaliumkurve.

Hemmung durch 0,1 n. Salzlösungen bei pH = 3,7 siehe l. c. S. 19, Fig. 17.

Die Spaltprodukte der Substrate hemmen stark. So fand Rona, dass die Autolyse immer bei etwa 50% Spaltung aufhörte. Wurden indessen die Spaltprodukte durch Dialyse beseitigt, so konnte trotz einer unvollständigen Dialyse eine Spaltung von mehr als 90% erreicht werden. Die Hemmung der Spaltungsprodukte kann möglicherweise auch als ein durch eintretende Synthese bedingtes Gleichgewicht angesehen werden.

Die Untersuchungen über die Beeinflussung der autolytischen Enzyme durch Schwermetallsalze usw. sind ohne Beachtung der Acidität ausgeführt und deshalb nicht verwertbar. So sind wohl die umfassenden Versuche von Izar[1], Truffi[2] und anderen über den Einfluss von Silber- und Quecksilbersalzen auf die Leberautolyse durch Aciditätsverschiebungen entstellt. Sie fanden durchgehend eine Aktivierung bei kleinen Salzmengen, eine Hemmung bei grösseren. Ähnliche Ursachen dürften auch bei den Versuchen über die Einwirkung von verschiedenen Kolloiden vorliegen[3]. In moderneren Versuchen fand auch Bradley, dass reine Kolloide auf die Autolyse keinen merklichen Einfluss ausübten[4].

Hata[5] fand Sublimat in kleinen Mengen stark hemmend. 1 ccm seines Leberextraktes wurde durch 0,03 ccm 1%iger Sublimatlösung vollkommen inaktiviert. Eine durch mehr als das Doppelte dieser Menge vollkommen vergiftete Enzymlösung konnte indessen durch eine passende Menge K_2S wieder ganz reaktiviert werden.

NaF ist ohne Einfluss (Rona[6]). Grössere Mengen können hemmen

[1] Izar, Biochem. Zs 20, 249; 1909.
[2] Truffi, Biochem. Zs 23, 270; 1909.
[3] Ascoli und Izar, Biochem. Zs 6, 192; 1907; 7, 142; 1907; 10, 356; 1908; 14, 491; 1908 und 17, 361; 1909.
[4] Jl Biol. Chem. 21, 209; 22, 113; 25, 201; 29, 281; 44, 553; 50, 14; 52, 466; 1922.
[5] Hata, Biochem. Zs 17, 182; 1909.
[6] Rona, Mislowitzer und Seidenberg, Biochem. Zs 154, 290; 1924.

wegen pH-Verschiebung. Rona hat auch eine Menge Arsenpräparate u. dgl. bei gemessenem pH untersucht und dadurch ältere Arbeiten richtiggestellt. Atoxyl hemmt. As_2O_3 und andere Arsenverbindungen (Asher) hemmen oder aktivieren je nach der Acidität. Vgl. auch Teil I, 2. Aufl., S. 216 u. ff.

Eine spezifische Aktivierung durch Galle ist nicht nachgewiesen. Angaben über den Einfluss von Lipoidgemischen und allerlei weniger definierten physiologisch wirksamen Stoffen sollten mit Vorsicht aufgenommen werden.

Chloroform soll die tiefere Spaltung hemmen[1], Jodoform ist recht unwirksam, was vielleicht mit seiner geringen Löslichkeit zusammenhängt[2].

Chinin hemmt, jedoch erst in recht grossen Mengen[3], ebenso Formaldehyd[4].

Eine Autolyse findet auch in stark alkoholischer Lösung statt. Nach Wells hemmen erst 90% Alkohol vollständig[5].

Proteasen der Milz.

Die proteolytischen Enzyme der Milz sind von Hedin und Mitarbeitern studiert worden. In Arbeiten über die Milzautolyse glaubten Hedin und Rowland[6] festgestellt zu haben, dass zwei Proteasen wirksam sind: eine in saurer Lösung (β-Protease) und eine in alkalischer (α-Protease). Die Wirksamkeit der α-Protease wurde am deutlichsten gezeigt, wenn die Milz zuerst mit schwacher Säure behandelt wurde. Es beruht dies darauf, dass die in der sauren Lösung eingetretene geringe Spaltung der Eiweissstoffe durch β-Protease (Pepsinase) Stoffe entstehen lässt, welche von der α-Protease (Tryptase) leichter angreifbar sind. Hedin konnte[7] auch eine gewisse Trennung der Milzenzyme erreichen:

Zerkleinerte Milz wird mit verdünnter Essigsäure behandelt: 24 Stunden bei 37° (Toluol), dann wird filtriert und mit Wasser gewaschen. Das Filtrat enthält manchmal alle Enzyme. Der Rückstand wird mit Caseinlösung während 24 Stunden behandelt. Der Caseinextrakt enthält hauptsächlich β-Protease und Erepsin. Der Rückstand wird gewaschen und danach mit 5% NaCl extrahiert. Die Lösung wird abfiltriert und mit 30 g Ammonsulfat zu 100 ccm versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert und dialysiert. Das Ungelöste wird abfiltriert und in wenig NaOH gelöst. Die Lösung enthält hauptsächlich α-Protease.

Dernby[8] fand das pH-Optimum des Gelatine-spaltenden Enzyms der Milz bei 3,5—3,8 (Pepsinase). Die peptonspaltende Tryptase hat ihr Optimum bei etwa 7,5.

---

[1] Kaschiwabara, H. 80, 45; 1912.
[2] Vandevelde, Biochem. Zs 3, 315; 1907.
[3] Laqueur, Arch. f. exp. Pathol. 55, 240; 1906.
[4] Kikkoji, H. 63, 109; 1909.
[5] Wells und Caldwell, Jl Biol. Chem. 19, 57; 1914.
[6] Hedin und Rowland, H. 32, 341 und 531; 1901.
[7] Hedin, Jl Biol. Chem. 54, 177; 1922.
[8] Dernby, Jl Biol. Chem. 35, 179; 1918.

Die Produkte der Milzautolyse wurden von Leathes[1], Cathcart[2] und Levene[3] untersucht.

Hedin gibt an, dass die pH-Optima der Wirkung der β-Proteasen bei Milz von verschiedenen Tieren nicht ganz identisch sind.

Morse fand Autolyse nur in saurer Lösung und weist darauf hin, dass die α-Protease nicht native Eiweissstoffe angreift[4]. Dies ist mit den Ver-

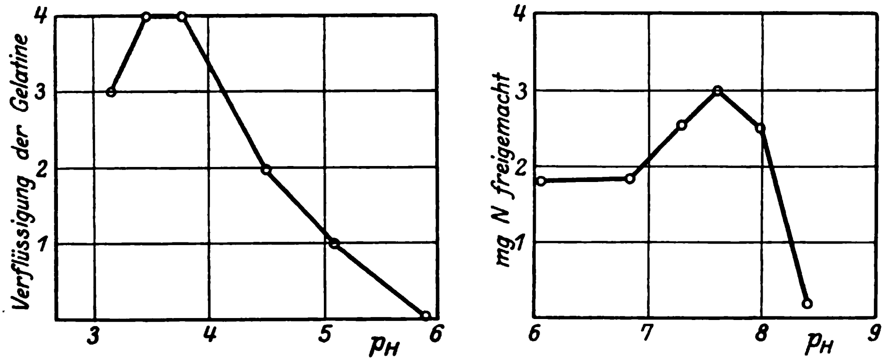


Fig. 75.

suchen von Dernby in Übereinstimmung. Wir führen Kurven von Dernby an (Fig. 75).

Über die Verdauung der eigenen Eiweissstoffe der Milz hat Dernby[5] ebenfalls Versuche angestellt. Eine Tabelle sei angeführt:

pH im Anfang (ändert sich wenig)	Vermehrung des Aminostickstoffs	
	16 Stunden	72 Stunden
etwa 3	0,03	0,06
etwa 4	0,40	0,78
5,0	1,06	1,28
6,2	0,43	0,73
6,8	0,15	0,43
7,3	0,38	0,69
7,6	0,55	0,78
7,9	0,74	0,98
8,4	0,09	—

Dernby findet also auch hier zwei Optima bei pH = 5 und etwa 8. Die Verteilung des durch Trichloressigsäure nicht fällbaren Stickstoffes zwischen den verschiedenen Reaktionsprodukten hat er in einigen Versuchen bestimmt:

[1] Leathes, Jl Physiol. 27, 360; 1902.
[2] Cathcart, Jl Physiol. 32, 299; 1904/1905.
[3] Levene, Amer. Jl Physiol. 11, 437 und 12, 276; 1905.
[4] Morse, Jl Biol. Chem. 31, 303; 1917.
[5] l. c. Seite 212.

pH im Mittel	mg nicht fällbaren Stickstoffs nach 48 Stunden bei 37°		
	Peptide	Amino-N	NH_3
3,0	24,8	38,5	2,3
4,1	55,2	142,3	6,2
6,1	2,6	87,9	7,3
7,5	3,3	83,0	5,1

In saurer Lösung werden also auch hier die Peptide angehäuft, was dafür spricht, dass die Pepsinase wie das Pepsin nur die ersten Stufen der Eiweissspaltung beschleunigt.

Wir wollen doch auch hier die Aufmerksamkeit darauf lenken, dass der Umstand, dass die Peptide in saurer Lösung angehäuft werden, nicht zwingend die Verschiedenheit des eiweissspaltenden und des peptonspaltenden Enzyms beweist. Wie schon z. B. die Carbohydrasen eine mit der Acidität wechselnde Kinetik zeigen, so ist dies bei den Proteasen sicher noch ausgeprägter der Fall.

Nach einer Untersuchung von Waldschmidt-Leitz und W. Deutsch[1] enthält die Milz zwei proteolytische Enzyme, eine Protease mit einem pH-Optimum von etwa 4, unwirksam gegenüber Peptiden, und daneben eine Peptidase mit dem Optimum pH = 8,0, spezifisch für die Hydrolyse einfacher Peptide. Der Peptidasengehalt ist sehr beträchtlich, der Proteasengehalt geringfügig, immerhin viel grösser als Hedin in seinen Extrakten fand. Es gelingt, in Glycerinauszügen aus frischer Milz, z. B. durch Adsorption an Kieselgur bei neutraler Reaktion, die beiden Enzyme zu trennen; dabei wird — im Gegensatz zu den Angaben von Hedin — überwiegend die bei saurer Reaktion wirksame Protease adsorbiert. Die Unterscheidung von α- und β-Lienoprotease nach Hedin erscheint also nicht mehr gerechtfertigt.

Proteasen der Nieren.

Die proteolytischen Enzyme der Nieren sind stark wirksam. Sie wurden schon früh untersucht[2]. Vergleichende Untersuchungen über die Autolyse gesunder und kranker Nieren bei Simon[3].

Hedin[4] hat die Existenz mehrerer Enzyme in den Nieren nachgewiesen: Er fand ein „Erepsin“ (nach unseren jetzigen Kenntnissen vielleicht eine Tryptase + eine Peptidase), das auf Pepton am besten bei pH = 7,8 wirkt, und eine Protease (Pepsinase), welche die Eiweisskörper des Organs und Casein am besten bei pH = 4,3—5,6 spaltet. Weder bei der optimalen Acidität der

[1] Waldschmidt-Leitz und Deutsch, Privatmitteilung.
[2] Dakin, Jl of physiol. 30, 84; 1904.
[3] Simon, Biochem. Zs 67, 483; 1914.
[4] Hedin, H. 122, 307; 1922.

Pepsinwirkung, noch in alkalischer Lösung wurden echte Eiweissstoffe angegriffen.

Die Angaben von Bradley[1] über die Proteasen der Nieren decken sich mit denen von Hedin. Wahrscheinlich haben wir hier eine Protease vom „Papaintypus". Vgl. unten die Pflanzenproteasen.

Proteasen der Thymusdrüse.

Die proteolytischen Wirkungen des Thymus wurden schon früh von Kutscher[2] und Conradi[3] studiert. Jones[4] fand im Thymus ein Enzym, welches die Nucleoproteide der Drüse unter Abspaltung von Phosphorsäure und Xanthinbasen angriff. Rhodin[5] beobachtete, dass die Proteolyse am besten in schwach saurer Lösung stattfindet.

Widmark[6] extrahiert Thymus mit schwacher Essigsäure und findet in dem Extrakt eine Pepsinase mit maximaler Wirkung bei pH = 5,6 und ein „erepsinähnliches" Enzym, welches Pepton am besten bei pH = 7,6 spaltet. Wenn er den Extraktionsrückstand dann mit NaCl-Lösung auslaugt, erhält er eine Lösung, die Casein bei pH = 7,8 — 7,9 spaltet. Bei einem anderen Verfahren wurde eine Lösung gewonnen, die Casein am besten bei pH = 8,8 spaltete.

Proteasen der Lymphdrüsen.

Mit der bei der Besprechung der Milzproteasen geschilderten Extraktionsmethode konnte Hedin[7] drei Enzyme in den Lymphdrüsen unterscheiden und wenigstens teilweise trennen. Er fand also eine Pepsinase, die Casein bei pH = etwa 5,5 optimal spaltet, eine Tryptase, die Casein bei pH 9—10 angreift und ein Erepsin. Das „Erepsin" spaltete Pepton und ist also wahrscheinlich mit einer Tryptase vergesellschaftet.

Proteasen der Magenschleimhaut.

Ausser dem Pepsin enthält die Magenschleimhaut auch andere Proteasen. In den Magensaft geht wahrscheinlich nur Pepsin und sogar beim Extrahieren der abgeschabten Schleimhaut mit Wasser erhält man nur Pepsin in der Lösung[8]. Wird dagegen die so von der Hauptmenge des Pepsins befreite Schleimhaut-Emulsion untersucht, so kommen auch die anderen Proteasen zu einer wahrnehmbaren Wirkung. So fand Dernby eine deutliche Peptonspaltung in alkalischer Lösung:

---

[1] Bradley, Jl of biol. Chem. 52, 466; 1922.
[2] Kutscher, H. 34, 114; 1901/1902.
[3] Conradi, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. Bd. 1.
[4] Jones, Am. Jl of Physil. 10, 24; 1904.
[5] Rhodin, H. 75, 197; 1911.
[6] Widmark, H. 135, 122; 1924.
[7] Hedin, H. 125, 289; 1923.
[8] Dernby, Jl Biol. Chem. 35, 202; 1918.

pH im Beginn	Zunahme des Aminostickstoffs
5,0	< 1,0
6,0	2,75
6,8	3,40
7,3	3,63
7,6	4,12
7,9	3,82
8,3	3,46

Es gibt also in der Magenschleimhaut ein tryptaseähnliches Enzym mit dem pH-Optimum etwa 7,6. Durch besondere Versuche wurde festgestellt, dass Pepsin bei seinem pH-Optimum Pepton nicht angriff.

Proteasen der Pankreasdrüse.

Nebst der eigentlichen Tryptase enthält die Pankreasdrüse auch andere Proteasen. Indessen ist die Wirkung des Trypsins verhältnismässig so gross, dass sie die etwaige Wirkung anderer Proteasen verdunkelt. Durch Waschen

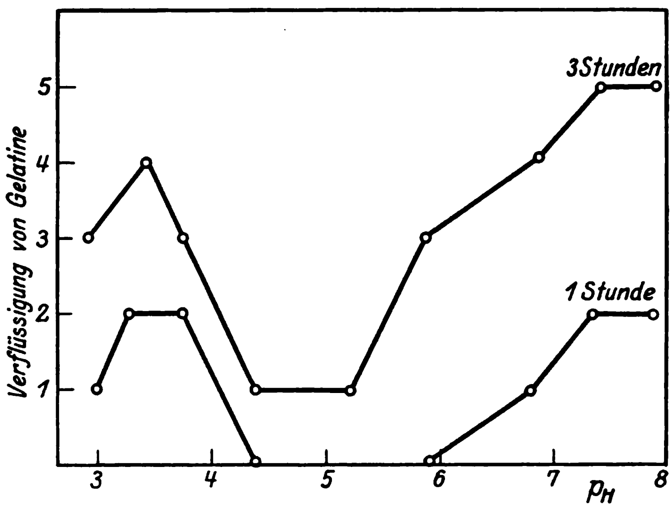


Fig. 76.

von gemahlener Drüse mit Wasser konnte aber Dernby die Hauptmenge der Tryptase entfernen und danach die Prüfung vornehmen. Er fand dann die Kurve (Fig. 76) für die Gelatinespaltung des Pankreas. In dem Pankreas gibt es also eine Pepsinase die bei pH = etwa 3,5 optimal wirkt[1].

Sonstige Organproteasen.

Muskel. Bei der Autolyse des Muskels lösen sich die quergestreiften Elemente. Nach Hedin und Rowland[2] enthält der Muskelpresssaft eine

[1] Dernby, Jl Biol. Chem. 35, 200; 1918.
[2] Hedin und Rowland, H. 32, 341 und 531; 1901.

Protease, die am besten in alkalischer Lösung wirkt. Die Muskelautolyse verläuft nach Bradley am schnellsten bei pH = 4,5 — 5[1].

Gehirn. Schwache Autolyse am besten bei schwach saurer Reaktion.

Lunge. Jacoby[2] fand Autolyse der Lungen. Die Enzyme lösen auch Fibrin usw.

Tumoren. Bei verschiedenen Geschwülsten ist eine kräftige Autolyse beobachtet worden. Über die Spezifität der Enzyme ist nichts Sicheres bekannt. Die Enzyme sind von Interesse, da es gelingt durch Injektion von Metallverbindungen die Autolyse so zu steigern, dass sich die Tumoren selbst verzehren.

Die Leukoprotease.

Die Leukocyten enthalten stark wirksame proteolytische Enzyme. Sie gelangen in alle Teile des Körpers und erklären eine Menge alter Angaben über Vorkommen von „Trypsin". Ebenso werden Angaben über Selbstverdauung gewisser Proteine durch die Anwesenheit von Leukocyten erklärt.

Opie[3] und Bradley[4] fanden das Optimum der Autolyse in schwach alkalischem Medium. Dernby[5] fand das Optimum der Gelatinespaltung bei pH = 3. Die Peptonspaltung, die viel schwächer war, verlief bei pH = 8 optimal. Es ist wohl möglich, dass die relativen Mengen der Enzyme in Leukocyten verschiedenen Ursprungs verschieden sein können, was die Unstimmigkeiten zwischen den obigen Resultaten erklären könnte.

Die Leukoproteasen sollen sehr stabil und gegen Gifte usw. recht unempfindlich sein. Gelöst werden ausser den oben genannten Stoffen Fibrin, Casein und koaguliertes Serum[6]. Auf interessante Gesichtspunkte von K. Thomas[7] sei in diesem Zusammenhang hingewiesen.

Placenta.

Die Placenta hat stark proteolytisch wirksame Enzyme. Fibrin wird verdaut. Die Wirkung ist am stärksten in alkalischer Lösung. Die Enzyme besitzen deshalb Interesse, weil durch ihre Wirkung wahrscheinlich die Überführung des Eiweisses der Mutter in das des Embryos vermittelt wird.

Proteasen der Milch.

Ob wirklich gelöste Proteasen in der Milch vorkommen, ist sehr unsicher. Man muss immer mit der Möglichkeit rechnen, dass Bakterien und Leukocyten mitwirken. Pennington[8] fand in Milch, die nach seiner Ansicht steril war, eine Protease, die besonders leicht Lactalbumin angriff. Immerhin sind die Mengen der Protease sehr gering. Möglich ist wohl, dass aus der

[1] Bradley und Chen, Jl Biol. Chem. 59, 151; 1924.
[2] Jacoby, H. 33, 126; 1901.
[3] Opie, Jl exp. Med. 7, 759; 1905; 8, 410; 1905; 8, 536; 1906; 9, 391; 1907.
[4] Bradley, Jl of Hyg. 10, 209; 1910.
[5] Dernby, Jl Biol. Chem. 35, 205; 1918.
[6] Jochmann und Lockemann, Hofm. Beitr. 11, 450; 1908.
[7] K. Thomas, Festschr. Kaiser Wilhelm-Ges. 1921.
[8] Pennington, Jl Biol. Chem. 16, 331; 1913. — Vgl. Gorini S. 572.

Milchdrüse Proteasen in die Milch übergehen. Die Proteasen der Drüse sind von Hildebrandt[1] und Grimmer[2] untersucht. Untersuchungen über Proteasen der Milchsäurebakterien verdankt man Chr. Barthel (Medd. Centralanst. Stockholm, Bakt. Afd. 1914—25).

B. Blutproteasen.

Proteasen des normalen Serums.

Es dürfte ziemlich sicher sein, dass im Serum normalerweise Proteasen zu finden sind. Eine zweite Frage ist freilich, ob sie eigentliche Blutenzyme sind oder aus irgendwie gestörten Organen ins Blut übergetreten sind.

Délezenne[3], Zunz[4] und andere fanden, dass normales Serum Gelatine und Casein, sowie koaguliertes Serum angreift, nicht dagegen koaguliertes Eieralbumin. Zunz meint, dass die Serumproteine anderer Tiere leichter angegriffen werden als die eigenen. Die Menge der Proteasen ist sehr schwankend auch bei demselben Tiere.

Da es nun bekannt ist, dass die Serumproteine auf proteolytische Enzyme eine grosse Hemmungswirkung ausüben, so wäre es möglich, dass tatsächlich recht wirksame Enzyme vorkommen, deren Wirkung aber durch die Hemmungskörper des Serums verhindert wird. Es hat sich auch gezeigt, dass oft in dem Serum nur sehr schwache proteolytische Wirkungen zu beobachten sind, die indessen nach Behandlung des Serums mit gewissen chemischen Mitteln sehr viel besser hervortreten können. So fand Hedin[5], mit der Gerbsäuremethode, dass das Serum von Rind und Pferd entweder keine oder eine sehr geringe Einwirkung auf Casein hatte, dagegen eine deutliche Einwirkung auf Pepton. Wurde das Serum mit Ammonsulfat fraktioniert gefällt, so enthielt die bei etwa $^1/_3$ Sättigung ausfallende Globulinfraktion Proteasen, die Casein und Pepton spalteten. Die zwischen halber und voller Sättigung ausfallende Albuminfraktion enthält Proteasen, die nur Pepton spalteten. Daneben enthielt diese Fraktion die Hemmungskörper.

Von Hedin und anderen[6] wurde weiter festgestellt, dass bei Behandlung des Serums mit organischen Antisepticis wie Chloroform und Äther die Hemmungswirkung des Serums geschwächt wurde.

Wir schliessen also, dass die Serumproteasen an andere Stoffe des Serums gebunden bzw. sorbiert sind, dass sie aber durch Störung dieser Bindungen zur Wirkung gebracht werden können. So treten oft nach Behandlung des Serums mit Sorptionsmitteln wie Kieselgur usw. Proteasenwirkungen hervor, ebenso nach Fällung mit Alkohol[7].

---

[1] Hildebrandt, Hofm. Beitr. 5, 463; 1904. — [2] Grimmer, Biochem. Zs 53, 429; 1913.

[3] Délezenne und Pozerki, Soc. Biol. 55, 327, 690; 1903.

[4] Zunz, Bull. Acad. Méd. Belgique. 1905. — [5] Hedin, H. 104, 11; 1918.

[6] Nolf, Arch. internat. Physiol. 18, 549; 1921. — Abderhalden, Fermentforschung 6, 340; 1922.

[7] Schierge (und Cöster), Zs exp. Med. 32, 142; 1923 und 34, 442; 1923.

Die Eigenschaften der Serumproteasen sind wenig bekannt. Sie sollen am besten bei pH = 7 wirken[1]. Sie sollen nicht organspezifisch sein.

Es ist bekannt, dass bei allerlei Krankheiten aus gestörten Organen verletzte Zellen in die Blutbahn gelangen, wobei sie natürlich ihre Proteasen mitführen. Auf diesem Umstand beruht die sog. „Abderhaldensche Reaktion" (siehe unten). Es ist nun eine Möglichkeit, dass die „normalen" Blutproteasen nichts anderes sind als solche aus irgend einer Ursache ins Blut gelangte Organproteasen. Vielleicht stammen sie aus Leukocyten.

Absolut unwahrscheinlich ist es also nicht, dass normale Proteasen im Blut fehlen und nur durch besondere Reize aus Organen bzw. Leukocyten ausgezogen werden. Abderhalden vertritt die Ansicht, dass völlig normales Serum keine Proteasen enthält.

Proteasen im Blut unter anormalen Verhältnissen.

Wird einem Tier fremdes Eiweiss parenteral eingeführt, so treten im Blut Proteasen auf, welche die Spaltung des zugeführten Eiweisses bewirken. So konnten Oppenheimer[2] und Heilner[3] von einer Verdauung im Blut sprechen. Möglich wäre, dass hierbei die eigentliche Umsetzung in irgend einem Organ erfolgte; Abderhalden hat indessen gezeigt, dass das Serum selbst der Einspritzung zufolge proteolytische und peptolytische Eigenschaften annimmt. Die deutliche Vermehrung der Proteasen nach Eiweissinjektion kann als sichergestellt betrachtet werden. Die so auftretenden Enzyme nannte Abderhalden „Abwehrfermente".

Abderhalden fand, dass das Serum Schwangerer die Fähigkeit besass, Placentaeiweiss abzubauen[4]. Wurde einem Tier Placentaeiweiss eingespritzt, so traten auch diese Proteasen auf. Diesen Befund erklärt Abderhalden so, dass bei der Gravidität Enzyme aus der Placenta ins Blut treten, welche organspezifisch wirken. Die sog. Abderhaldensche Reaktion besteht also darin, dass bei gewissen Störungen der Organe im Blut organspezifische Enzyme auftreten. Ob die gefundene Vermehrung der Proteasen bei diesbezüglichen Störungen auf dem Übertreten von Organenzymen oder auf Freilegung von Leukocytenproteasen oder auf einer Aufhebung der Hemmung an vorher schon vorhandenen Serumproteasen beruht, ist indessen gar nicht klar. Über die Spezifität der Enzyme und also über die medizinische Verwendbarkeit der Abderhaldenreaktion sind die Meinungen ebenfalls geteilt. Im III. Teil dieses Werkes wird sich noch Gelegenheit finden, auf diese Fragen ausführlicher zurückzukommen.

---

[1] Okubo, Ber. Ges. Physiol. 27, 195 und 28, 467.
[2] Oppenheimer, Hofm. Beitr. 4, 263; 1903.
[3] Heilner, Zs Biol. 56, 75; 1911.
[4] Abderhalden, Siehe z. B. H. 77, 249; 1912. — Siehe auch Abderhaldens Monographie „Abwehrfermente" (in neueren Auflagen „Die Abderhaldensche Reaktion"), 5. Aufl., 1922.

C. Proteasen der niederen Tiere.

Über die Proteasen der niederen Tiere ist nur weniges bekannt, und Arbeiten mit moderner Methodik fehlen beinahe vollständig. Es dürfte indessen sicher sein, dass wir auch hier dieselben Proteasen haben wie in den Organen der höheren Tiere. So konnten Bodansky und Rose[1] nachweisen, dass bei Cölenteraten sowohl eine Pepsinase mit dem Optimum ihrer Wirkung bei pH = 3 und eine Tryptase mit dem pH-Optimum 7 vorkommt. Im Magen der Honigbiene fand Sarin[2], allerdings ohne Messung von pH, eine Pepsinase, die in saurer Lösung Gelatine, Fibrin und Casein löst, und eine in alkalischer Lösung wirksame Tryptase.

Bei den Insekten sollen die Proteasen in grösserer Menge in den carnivoren Arten vorkommen[3]. Schon 1858 fand Basch eine Protease in Blatta orientalis[4].

In Leber und Bauchspeicheldrüse des Skorpions, Buthus doriae, fand Sarin[5] eine Pepsinase. Die Auszüge aus der Leber verflüssigten auch Gelatine und lösten Casein in neutraler und alkalischer Lösung, was auf die Anwesenheit einer Tryptase deutet. Schwächer wirkten in diesem Falle die Auszüge aus der Bauchspeicheldrüse.

Bei Crustaceen kommen in der Leber Proteasen vor. Pepsinasen sollen fehlen. Dagegen finden sich Tryptasen[6].

Im Lebergewebe des Hepatopankreas der Cephalopoden werden Proteasen erzeugt. Sie sollen bei saurer Reaktion am meisten wirksam sein[7].

Auch in der Leber der Mollusken hat man Proteasen gefunden[8].

In Würmern kommen wirksame Proteasen vor, worauf Charles Darwin zuerst hingewiesen hat. Im Darm von Haemopis soll eine Pepsinase existieren, die in recht saurer Lösung wirken soll[9].

Die meisten der zitierten Arbeiten — und dies gilt auch von einer Menge anderer Beiträge über Proteasen in niederen Tieren — sagen nur wenig über die Art der gefundenen Enzyme. Für die Enzymchemie ist es von weniger Interesse zu wissen ob Proteasen bei allen möglichen Tieren zu finden sind; dagegen ist es eine Aufgabe künftiger Untersuchungen zu zeigen, ob die Enzyme mit den besser bekannten Enzymen der höheren Tiere identisch sind, oder ob sie in anderer Weise wirken.

---

[1] Bodansky und Rose, Amer. Jl of Physiol. 62, 473; 1923.
[2] Sarin, Biochem. Zs 135, 59; 1923.
[3] Bonnoure, C. r. 152, 228; 1911.
[4] Basch, Wien. Akad. 33, Math.-Nat. Kl. 225; 1858.
[5] Sarin, Biochem. Zs 129, 359; 1921.
[6] Hoppe-Seyler, Pflüg. Arch. 14, 394; 1877.
[7] Bourquelot, C. r. 95, 1174. — Cohnheim, H. 35, 396, 416; 1902.
[8] Siehe z. B. Biedermann und Moritz, Pflüg. Arch. 75, 1, 1899.
[9] Spiess, Diss. Genf 1903.

22. Kapitel.

Proteasen der höheren Pflanzen.

Da im allgemeinen die Proteasen der Pflanzen so wenig untersucht sind, dass eine Systematik noch nicht möglich ist, so beschreiben wir hier zuerst die Proteasen der Säfte und Gewebe der Pflanzen und danach die Enzyme der sog. carnivoren Pflanzen.

A. Papain.
B. Ananasprotease.
C. Protease aus Cucurbita Pepo.
D. Übrige Enzyme in Säften und Früchten.
E. Proteasen in Samen und Geweben.
F. Proteasen der carnivoren Pflanzen.

A. Papain.

Schon 1750 beschrieb Griffith Hughes in seiner „Natural History of Barbados" die eiweisslösende Wirkung des Milchsaftes von dem sog. Melonenbaum, Carica Papaya L. Das eiweissspaltende Enzym, das Papain oder Papayotin, wurde zuerst 1879 von Wurtz untersucht[1]. Er fand, dass man aus dem rohen, durch Auspressen aus dem Gewebe der Pflanze erhaltenen Saft mittels Alkohol das unreine Enzym fällen kann. Er gibt an, dass das Enzym in neutraler Lösung tierisches Eiweiss in Peptone und Leucin spaltet.

Martin[2] fand auch, dass das Papain am besten in neutraler Lösung wirkt. Die Optimaltemperatur fand er bei 35°—40°.

Vines[3] hat später sorgfältige Untersuchungen über das Papain angestellt. Speziell hat er die Wirkung von Antisepticis untersucht und dabei die eigentümliche Wirkung des Cyanwasserstoffs bemerkt, die Ursache dazu aber nicht erkannt. In einer folgenden Untersuchung von Mendel und Blood[4] wurde dagegen klar ausgesprochen, dass die Blausäure die Rolle eines Aktivators oder Co-Enzyms für das Papain spielt. Von anderen untersuchten

[1] Wurtz, C. r. 90, 1379; 1880; 91, 787; 1880. — Wurtz und Bouchut, C. r. 89, 425; 1879. — Dieselben, Le Papaïne, Paris 1879.

[2] Martin, Jl of Physiol. 5, 313; 1884 und 6, 336.

[3] Vines, Annals of Botany. 16, 1; 1902; 17, 237 und 597, 1903; 18, 289; 1904; 19, 149 und 171, 1905; 20. 113; 1906; 22, 103; 1908; 23, 1; 1909; 24, 213; 1910.

[4] Mendel und Blood, Jl Biol. Chem. 8, 177; 1910.

Substanzen konnte nur der Schwefelwasserstoff eine ähnliche Aktivierung hervorrufen. Es sei darauf hingewiesen, dass bei vielen Enzymen eine Regeneration nach Metallvergiftung eben durch diese Stoffe leicht und vollständig gelingt. Dass dies im Falle von Papain die Ursache der Aktivierung nicht sein kann, geht schon aus der Untersuchung von Mendel und Blood hervor. Sie zeigten nämlich: Die Aktivierung durch HCN beruht nicht auf a) einer Änderung der Wasserstoffionenkonzentration, b) Zerstörung von Hemmungsstoffen in der Papainlösung, c) Zerstörung von hemmenden Stoffen in dem Substrat, d) einer Denaturierung des Substrats, e) einer Überführung eines Zymogens in ein Enzym. Sie finden, dass die Wirkung der Blausäure am besten als die eines Co-Enzyms aufgefasst werden kann. Zu demselben Schluss kommen in letzter Zeit Willstätter und Mitarbeiter in ihren ausgezeichneten Untersuchungen über pflanzliche Proteasen. Sie fanden[1], dass die Wirkung von HCN auf Papain grosse Ähnlichkeit hat mit der Beziehung zwischen Enterokinase (Co-Tryptase) und Tryptase[2]. Auch die Aktivierung des Papains erfordert eine gewisse Zeit.

Der wichtigste Befund Willstätters bezüglich Papain ist indessen der, dass die Spezifität des Papains von der des aktivierten Enzyms deutlich verschieden ist. Das Papain und das Papaincyanhydrin sind zwei verschiedene Proteasen. Während das nicht aktivierte Enzym zwar Gelatine und andere natürliche Eiweissstoffe anzugreifen vermag, kann es Peptone nicht spalten, und zwar weder die durch seine eigene Wirkung entstandenen, noch käufliche Präparate. Das aktivierte Enzym spaltet dagegen diese Peptone weitgehend. Auch dieses Verhalten ist in Übereinstimmung mit dem bei Trypsin gefundenen, indem die nicht aktivierte Tryptase gewisse einfachere Stoffe angreifen kann, die höheren Proteine dagegen erst in Verbindung mit der Enterokinase spaltet. Die Spezifität der Tryptase und des Papains ist also vertauscht.

1. Bestimmung.

Zur Messung der proteolytischen Wirkung der Pflanzenproteasen eignen sich dieselben Methoden wie bei den Tierproteasen. Am besten ist die Formoltitration nach Sörensen oder die Alkalititration in alkoholischer Lösung nach Waldschmidt-Leitz. Als Substrat für vergleichende Bestimmungen kann Gelatine dienen. Nach Willstätter und Grassmann sind hohe Gelatinekonzentrationen günstig, da hier das Leistungsvermögen des Enzyms ausgenützt wird und kleine Volumina zur Titration genügen.

2. Adsorptionsverhalten des Papains.

Reinigung durch Kaolin und Tonerde. Eine Vorreinigung kann durch Alkoholfällung erzielt werden. Am besten setzt man zuerst zu dem

[1] Willstätter und Grassmann, H. 138, 184; 1924.
[2] Waldschmidt-Leitz, H. 132, 181; 1923/24.

rohen Saft etwas Blausäure und überlässt das Gemisch während einiger Zeit der Selbstverdauung. Danach fällt man mit Alkohol und erreicht so eine Konzentration, die etwa dreimal so gross ist wie die der Rohlösung.

Durch Kaolin lässt sich das Papain sowohl in wässeriger, wie in alkoholhaltiger Lösung und bei verschiedenen Aciditäten leicht sorbieren. Die Sorption durch Tonerde ist dagegen von allen diesen Verhältnissen stark abhängig. Am besten wird Papain aus schwach ammoniakalischer Lösung sorbiert, und kann aus dem Sorbat durch verdünnte Essigsäure eluiert werden. Viel leichter wird es aus alkoholhaltiger Lösung sorbiert; der Einfluss des Alkohols ist bei Konzentrationen weit unter der beginnenden Fällung schon sehr beträchtlich. Glycerin verhindert die Sorption.

3. Kinetik.

Enzymmenge und Reaktionsgeschwindigkeit. Um eine Messungsmethode für Papain zu begründen, die zur Bestimmung der Ausbeute bei Reinigungsversuchen usw. dienen kann, haben Willstätter und Grassmann die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymmenge untersucht. Wir führen einen Versuch an. Das Enzym (käufl. Succus Caricae) wurde während zwei Stunden mit 5 mg HCN in 20 ccm vorbehandelt. In dieser Zeit wird die maximale Aktivierung erreicht. Danach Gelatinespaltung bei pH = 5,2 und 40°. Die Spaltungsgrade sind in ccm 0,2 n KOH angegeben.

Enzymmenge (mg) für 0,4 g Gelatine in 10 ccm	Reaktionsdauer in Stunden				
	0.5	1,0	1,5	2,0	4,0
1,25	0,26	0,50	0,66	0,82	1,14
2,5	0,61	0,97	—	1,40	1,77
5	0,87	1,26	1,54	1,77	2,20
10	1,23	1,73	2,02	2,20	2,62
20	1,50	1,96	—	2,48	2,76

In Figur 77 stellen die Autoren die Spaltung nach einer Stunde als Funktion der Enzymmenge dar. Der Zusammenhang ist nicht einfach. Vielleicht spielen natürliche Hemmungskörper mit, da die Kurve den entsprechenden bei Pepsin usw. recht ähnlich ist.

Zeitlicher Verlauf. Hier wie bei den anderen Proteasen wird der zeitliche Verlauf der Eiweissspaltung von so vielen, wenig bekannten Faktoren beeinflusst, dass eine Aufstellung von Formeln keinen Sinn hat. Wie schon aus der obigen Versuchsreihe hervorgeht, wird die Spaltungsgeschwindigkeit besonders bei den grösseren Enzymmengen mit der Zeit sehr rasch verkleinert. Dies ist auch hier auf die verzögernde Wirkung der Spaltprodukte zurückzuführen.

Einige durch Papain nicht weiter spaltbare Produkte haben Willstätter und Grassmann auf ihre hemmende Wirkung geprüft. Für Leucyl-Glycin liess sich mit Gelatine als Substrat eine Hemmung nachweisen. Gelatinepepton, durch Papain dargestellt, wirkte auch hemmend, sowohl auf Papain wie auf Cyanhydrin. Eine grössere Hemmung wird durch das weniger abgebaute käufliche Pepton aus Albumin ausgeübt. Sie erstreckt sich auch auf das Cyanhydrin.

Zeitlicher Verlauf der Aktivierung durch Cyanwasserstoff. (Nach dem Vorgange von Willstätter wird die Verbindung Enzym-HCN, kurz Papaincyanhydrin genannt.) Der Cyanwasserstoff wirkt auf Papain

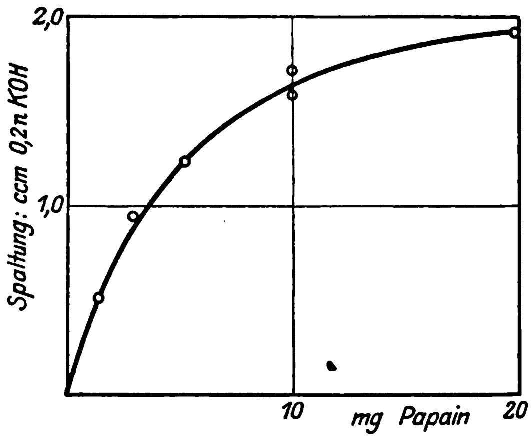


Fig. 77.

mit messbarer Geschwindigkeit ein. Mischt man Papain mit einer grösseren Menge HCN und entnimmt nach verschiedenen Zeiten Proben, deren eiweissspaltende Wirkung gemessen wird, so ergibt sich eine mit der Zeit steigende Proteasenwirkung. Es zeigt sich dabei, dass nach einer gewissen Zeit ein Maximum erreicht wird und dass die Wirkung danach wieder bis zu einem konstanten Wert abnimmt. Die Erklärung dieses auffallenden Verhaltens findet Willstätter in der verschiedenen Spezifität des Papains und des Cyanhydrins. Aus seinen Arbeiten geht, wie wir oben schon gesagt haben, hervor, dass das Cyanhydrin gewisse Bindungen im Eiweissmolekül löst, die nicht von dem Papain angegriffen werden, und umgekehrt deuten die Versuche nach Willstätter darauf hin, dass für die Lösung gewisser anderer Bindungen das nicht aktivierte Papain überlegen ist. Es kann also für gewisse Substrate eine bestimmte Mischung von Papain und Cyanhydrin besser wirken als das reine Cyanhydrin. Als Beispiel für die Aktivierung durch HCN wird folgende Tabelle angeführt:

Hydrolyse von Gelatine bei 40°. Spaltungsbeträge in ccm 0,2 n KOH angegeben:

Für jede einzelne Hydrolyse von 0,4 g Gelatine in 18 ccm, angewandt:		Dauer der Aktivierung vor dem Vermischen mit dem Substrat (Stunden)				
Papain mg	Blausäure mg	0	0,5	1	2	längere Zeit
9 0	0,98	1,30	1,48	—	1,34	1,38 n. 3,5 St.
9,0	24,4	1,28	1,91	2,00	1,91	—
9,0	4,8	1,26	1,76	1,98	1,82	1,83 n. 6 St.
4,5	4,8	0,83	—	1,43	1,45	1,47 n. 19 St.
2,25	4,8	0,58	—	0,79	1,03	1,07 n. 19 St.

Wie früher Mendel und Blood kommen auch Willstätter und Grassmann zu dem Schluss, dass die Papainaktivierung durch HCN nicht etwa auf Beseitigung von Hemmungskörpern u. dgl. beruhen kann. Wenn nämlich nach den verschiedensten Reinigungen die Aktivierung untersucht wurde, zeigte sich dieselbe Abhängigkeit von der Zeit usw. [1].

Mendel und Blood fanden, dass, wenn die Blausäure durch einen Luftstrom aus der Lösung ausgeblasen wurde, die Aktivierung zurückging, um bei erneuertem Zusatz von HCN wieder aufzutreten. Diese Versuche wurden von Willstätter völlig bestätigt. Am besten entfernt man die Blausäure durch Eindampfen im Vakuum. Der zeitliche Verlauf der neuen Aktivierung durch HCN ist derselbe wie derjenige der ersten. Auch das Maximum nach einstündiger Einwirkung findet sich wieder. In folgender Tabelle haben Willstätter und Grassmann einige Aktivierungsversuche mit verschiedenen Papainpräparaten zusammengefasst:

Vorbehandlung	Dauer der Einwirkung vor dem Vermischen mit dem Substrat (Stunden)				
	1 Min.	0,5	1	2	längere Zeit
Keine	1,26	1,77	1,98	1,82	1.83 n. 6 St.
Gereinigt durch Alkoholfällung .	1,11	1,80	1,94	1,86	1,81 n. 4 St.
Gereinigt durch Tonerdesorption .	1,31	1,82	—	1,98	—
Aktiviert, von HCN befreit, wieder aktiviert	1,07	1,60	1,81	1,70	1,73 n. 18 St.

Aktivierung durch H_2S.

Die schon von Mendel und Blood gefundene Aktivierung durch Schwefelwasserstoff haben Willstätter, Grassmann und Ambros genauer studiert[2]. Sie fanden, dass in den Fällen, wo Papain allein wirkungslos ist (mit genuinem Eieralbumin und mit Pepton), Schwefelwasserstoff ein geeignetes Co-Enzym ist, dass in einigen Fällen ebenso gut wirkt wie HCN, in anderen Fällen schwächer.

[1] Vgl. Myrbäck: H. 158, 160; 1926 u. zwar S. 231.
[2] Willstätter, Grassmann und Ambros, H. 151, 286; 1926.

Mit Schwefelwasserstoff konnte ein zeitlicher Verlauf der Aktivierung nicht festgestellt werden, sondern diese Reaktion scheint mit grosser Geschwindigkeit zu verlaufen.

Die Spezifität des Papains und des Cyanhydrins.

Wie früher schon gesagt ist, haben Willstätter und Mitarbeiter gefunden, dass die Aktivierung des Papains mit HCN nicht bloss eine Geschwindigkeitssteigerung bedeutet, sondern dass das Cyanhydrin als proteolytisches Enzym für gewisse Substrate spezifisch ist.

Mendel und Blood beobachteten, dass für die Spaltung von Pepton Witte und für das Auftreten von Tyrosin und Leucin bei der Spaltung von Eieralbumin die Anwesenheit von HCN erforderlich ist. Willstätter und Grassmann fanden, dass bei Behandlung von „Pepton ex Albumine Merck" mit nicht aktiviertem Papain in den ersten Stunden eine kleine Spaltung eintrat, die indessen in den folgenden Stunden und Tagen nicht zunahm. In diesem Pepton sind also nur vereinzelte Bindungen von Papain lösbar. Papain + HCN bewirkt dagegen eine durchgreifende Hydrolyse.

Enzym	Reaktionsdauer in Stunden			Reaktionsdauer in Tagen			
	1	2	4	1	2	4	8
Papain ohne HCN .	0,16	—	0,16	0,14	—	—	0,17
Papain mit 2,5 mg HCN vorbehandelt	0,22	0,31	0,41	0,71	0,94	1,09	1,19

Ähnliche Verhältnisse wurden bei dem Abbau von Gelatinepeptonen gefunden. Dass bei der Papainwirkung grosse Mengen von Aminosäuren entstehen, wurde schon durch die ersten Arbeiten über dieses Enzym bekannt. Die Wirkung des Papains auf einfache Peptide prüften zuerst Abderhalden und Teruuchi[1]. Mit sehr grossen Enzymmengen konnten sie Glycyl-l-Tyrosin spalten. Dagegen konnte Frankel[2] keines der Dipeptide Glycylglycin, Alanylglycin, Glycylalanin, Alanylalanin und Glycyltyrosin zerlegen. Neuerdings fanden auch Willstätter und Grassmann sowohl Papain wie sein Cyanhydrin gegen Glycylglycin und d-l-Leucylglycin völlig inaktiv. Dagegen wurde das Tripeptid Leucyl-Glycyl-Leucin durch Papaincyanhydrin, wenn auch langsam, gespalten.

Aciditätskurve. Baginski[3] fand das Wirkungsoptimum in neutraler Lösung. In alkalischer Lösung fand es Emmerling[4] und Rippetoe[5], in

[1] Abderhalden und Teruchi, H. 49, 21; 1906.
[2] E. M. Frankel, Jl Biol. Chem. 31, 201; 1917.
[3] Baginski, H. 7, 211; 1883.
[4] Emmerling, Chem. Ber. 35, 695; 1902.
[5] Rippetoe, Jl of Ind. and Engin. Chemistry 4, 517; 1912.

saurer Graber[1]. Frankel[2] hat mit Indicatoren die wahre Acidität ermittelt und fand das Optimum bei pH = etwa 5. Für Papain + HCN fand er dasselbe Optimum, nur mit langsamerer Senkung nach der alkalischen Seite hin. Willstätter und Grassmann fanden auch das Optimum der Gelatinespaltung bei pH = 5. Der Abfall der Kurve ist nach der sauren Seite steil, nach der alkalischen flach. Genau dasselbe Optimum wurde beim Papaincyanhydrin gefunden (Fig. 78).

Salzwirkungen. Nach Willstätter haben die Salze der gewöhnlichen Puffermischungen keinen spezifischen Einfluss. Ältere Angaben über

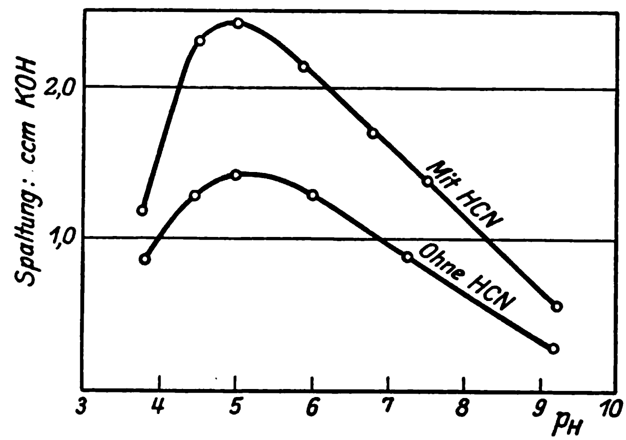


Fig. 78.

Förderung und Hemmung durch Salze sind im allgemeinen durch Aciditätsverschiebungen zu erklären.

Bezüglich NaF fanden Willstätter, Grassmann und Ambros, dass die Peptonspaltung gar nicht beeinflusst, dagegen die Fibrinlösung merklich gehemmt wurde. Dies hängt wohl damit zusammen, dass im letzten Falle das Substrat fest ist.

4. Verschiedene Substrate.

Wie bei den tierischen Proteasen war auch hier zu erwarten, dass das pH-Optimum mit dem Substrat variiert.

Wie man sich auch die Bindung zwischen Enzym und Eiweiss vorstellen mag, so muss in jedem Falle der Dissociationszustand des Eiweisses von Bedeutung sein. Willstätter und Mitarbeiter haben nun verschiedene Substrate untersucht: Gelatine gab, wie oben erwähnt, das Optimum bei 5. Der isoelektrische Punkt der Gelatine ist 4,8.

Für Albuminpepton fanden sie dasselbe Optimum bei 5. Das Albuminpepton hat auch bei etwa 4,8 seinen isoelektrischen Punkt. Über

[1] Graber, Jl of Ind. and Engin. Chemistry 3, 919; 1911.
[2] E. M. Frankel, Jl Biol. Chem. 8, 177; 1910.

die Fibrinlösung durch Papain berichten die älteren Arbeiten, dass sie am besten in schwach alkalischer Lösung verläuft. In guter Übereinstimmung damit fanden Willstätter, Grassmann und Ambros[1] das pH-Optimum der Fibrinlösung bei 7,1—7,3. Bemerkenswert ist, dass nach Kugelmass[2] der isoelektrische Punkt des Fibrins bei pH = 7,2 liegt. Die Aciditätskurve findet sich in der Figur 79.

Aus den Versuchen von Willstätter scheint also hervorzugehen, dass das Spaltungsoptimum recht gut mit den isoelektrischen Punkten der einzelnen Proteine zusammenfällt. Aus diesen Tatsachen schliesst Willstätter, dass das Papain der Typus einer dritten Gruppe von Proteasen ist, in welcher die Enzyme im Gegensatz zu Pepsin und Pankreastryptase das isoelektrische Eiweiss binden und spalten. Diese Enzyme scheinen nach den Untersuchungen der letzten Zeit, vor allem nach denen der Willstätterschen Schule, mehr verbreitet zu sein, als man früher vermutet hat. Dahin gehören die Protease der Hefe und vielleicht die sog. Gewebspepsinasen. Für eine künftige rationelle Einteilung der Proteasen dürfte dieser Gesichtspunkt leitend werden.

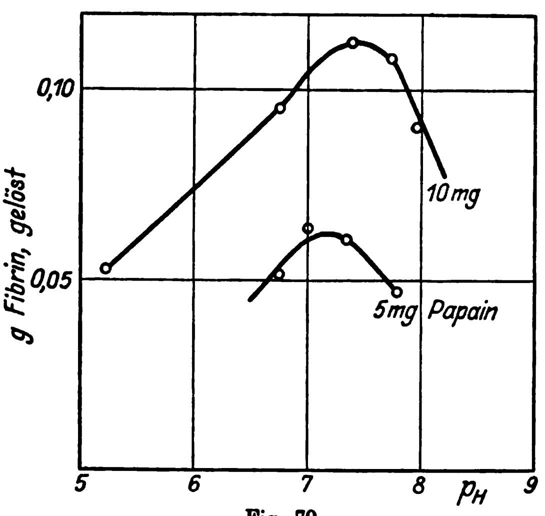


Fig. 79.

Die Wirkung des Papains auf genuines Eieralbumin ist nach den schon früher besprochenen Untersuchungen von Délezenne, Pozerski u. a. bei gewöhnlicher Temperatur nicht merkbar. Bei relativ hoher Temperatur wird die Wirkung bedeutend. Willstätter hat dieses Phänomen auf die verschiedene Angreifbarkeit des nativen und des denaturierten Eieralbumins zurückgeführt. „Der Unterschied im Verhalten des genuinen und des denaturierten Eiweisskörpers beruht wohl im wesentlichen auf konstitutionellen Änderungen der Proteine, mit denen die Denaturierung verbunden ist. Man erkennt in dem Enzym ein feines Reagens auf die konstitutionellen Eigentümlichkeiten des Substrates."

In folgender Tabelle stellen Willstätter und Mitarbeiter die Resultate über die Spaltung des Eieralbumins zusammen. Das Eieralbumin wurde nach einer besonderen Methode hergestellt, um jede Denaturierung auszuschliessen.

[1] Willstätter, Grassmann und Ambros, H. 151, 307; 1926 u. z. S. 315.
[2] Kugelmass, C. r. Soc. Biol. 87, 802; 1922.

Wir sehen aus der Tabelle, dass bei 40° das nicht aktivierte Papain das native Eieralbumin kaum angreift, dagegen leicht denaturiertes spaltet. Bei 70° findet man eine recht bald aufhörende Wirkung auf das native Eiweiss.

Versuch bei 40° Substrat	Aktivator	Spaltung (ccm n/8 KOH) nach Reaktionsdauer in Stunden			
		2	4	24	72
Eieralbumin nativ . .	—	0,07	—	0,13	0,10
" " . .	5 mg HCN	0,31	0,42	1,57	3,12
" " . .	0,7 mg H_2S	0,19	0,28	0,65	1,01
" denaturiert	—	—	0,94	1,08	1,22
Versuch bei 70°		**Reaktionsdauer in Minuten**			
		10	30	60	120
Eieralbumin nativ . . .	—	0,13	0,26	0,31	0,32

Bemerkenswert ist in diesen Versuchen, dass das Papaincyanhydrin das native Eieralbumin zu spalten vermag. Bindungen in dem nativen Eiweiss, die nur von dem aktivierten Enzym gelöst werden, werden durch die Denaturierung in solche verwandelt, welche auch von dem nicht aktivierten Enzym angegriffen werden können.

5. Einfluss der Temperatur.

In fast allen älteren Untersuchungen wurde für Papain ein auffallend hohes Temperaturoptimum gefunden[1]. So ist behauptet worden, dass noch bei 90° und 100° eine starke Proteolyse stattfindet. Wurde ein passendes Gemisch von Papain mit Eieralbumin oder Serumeiweiss über freier Flamme erhitzt, so wurde beim Kochen beinahe kein Koagulum erhalten. Bei 40°, wo die Papainwirkung im allgemeinen optimal verläuft, wurden diese Substrate äusserst langsam angegriffen. Diese und ähnliche Versuche würden für eine ausserordentliche Hitzestabilität des Papains sprechen. Wie schon Mendel und Blood die Erscheinung als die gewöhnliche Wechselwirkung zwischen Zerstörung und mit der Temperatur vergrösserter Reaktionsgeschwindigkeit erklärten, haben in neuerer Zeit Willstätter und Grassmann gezeigt, dass das Papain auch in Anwesenheit von HCN und viel Substrat, welches das Enzym schützt, 90° nicht erträgt. Eine Temperatur von 80° bewirkt schon unter denselben Verhältnissen eine sehr schnelle Zerstörung. Die grossen Anfangswirkungen bei hohen Temperaturen treten vor Erreichung dieser Temperaturen ein.

[1] Délezenne, Mouton und Pozerski, C. r. Soc. Biol. 60, 68, 309; 1906. — Pozerski, Ann. Inst. Pasteur, 23, 205, 321; 1909. Griffith Hughes schreibt: "This juice is of so penetrating a nature, that if the unripe fruit when unpeeled is boiled with the toughest old salt meat, it will soon make it soft and tender."

Die Optimaltemperatur ist nach den alten Untersuchungen 45°—60°. Nach Willstätter und Grassmann liegt sie bei 65°—70°. Die Geschwindigkeit der Anfangsspaltung steigt im Intervall von 30°—70° bei einer Temperatursteigerung von 10° auf etwa das Doppelte.

B. Die Ananasprotease (Bromelin).

Diese Protease kommt im Saft von Ananassa sativa vor und hat im Handel Bedeutung erlangt. Die Frucht ist ausserordentlich saftreich: jede Ananas von Durchschnittsgrösse liefert etwa einen Liter Saft. Der Saft reagiert sauer, er enthält viel Zucker, aber wenig koagulierbares Eiweiss. Der Trockensubstanzgehalt ist durchschnittlich 10%.

Die Proteasen der Ananas sind am eingehendsten von Chittenden[1], Vines[2] und Caldwell[3] untersucht worden. In neuerer Zeit ist das Studium dieser Protease von Willstätter und Mitarbeitern wieder aufgenommen worden[4].

Das Enzym kann aus dem Saft mit Alkohol niedergeschlagen werden. Der sehr zuckerreiche Niederschlag lässt sich indessen nur schwer in trockener Form gewinnen, was grosse Verluste an Enzym verursacht.

Auch die von Chittenden und Caldwell angewandten Methoden der Fällung mit Kochsalz führen zu zu grossen Verlusten an Aktivität.

Wie Willstätter fand, lässt sich das Enzym durch $^3/_4$-Sättigung mit Ammonsulfat ohne Verlust in dem 20—40fachen Reinheitsgrad aussalzen. Der Niederschlag wird sehr rasch abzentrifugiert und mit Alkohol und Äther getrocknet. Aus einem Liter erhält man in dieser Weise etwa 5 g Trockenpräparat.

Eigenart der Ananasprotease. Nach Vines soll das Bromelin, in schärfstem Gegensatze zu Papain, von HCN gehemmt werden. Seine Versuche waren mit der ungenauen Methodik der dermaligen Zeit angestellt und der genannte Befund dürfte irrig sein. Willstätter findet, dass das Bromelin wie das Papain von HCN aktiviert wird. Ohne HCN vermag es Gelatine zu spalten, die Wirkung wird durch HCN um etwa 50% vergrössert. Gegen Albuminpepton ist das Bromelin zum Unterschiede von Papain nicht wirkungslos, wirkt aber nur sehr schwach und wird auch hier bedeutend durch HCN aktiviert. Auch H_2S aktiviert. Besonders beim Albuminpepton ist die Wirkung der des Papains vergleichbar. Willstätter schliesst: „Die Protease des Ananas steht dem Papain sehr nahe. Sie könnte ein besonderes Enzym sein, das dem Papain sehr ähnlich wäre; aber die Erscheinungen sind auch vollständig so zu verstehen, dass die Ananasprotease und das Papain iden-

[1] Chittenden, Trans. Conn. Acad. 8. Dec. 1891. — Jl of Physiol. 15, 249; 1894.
[2] Vines, Annals of Botany 17, 597; 1903; 19, 149; 1905.
[3] Caldwell, Bot. Gaz. 39, 409; 1905.
[4] Willstätter, Grassmann und Ambros, H. 151, 286; 1926; H. 151, 307; 1926.

tisch sind und die beobachteten Unterschiede (Wirkung auf Peptone, wenn auch schwache; geringere Aktivitätssteigerung durch die Zusatzstoffe) durch Vergesellschaftung mit einem natürlichen Aktivator bedingt sind.“ In der folgenden Beschreibung einiger Eigenschaften der Ananasprotease findet man Belege für diese Ansicht.

Temperatur. Der Ananassaft arbeitet nach alten Angaben am kräftigsten bei Temperaturen zwischen 50° und 60°. Noch bei 70° zeigt er eine starke Wirkung.

Aktivierung. Die Ananasprotease wird in verschiedenen Reinheitsgraden von HCN aktiviert. Der Effekt ist deutlich, aber bei verschiedenen Präparaten verschieden gross. Auch hat Schwefelwasserstoff, wie oben erwähnt, eine aktivierende Wirkung. In der folgenden Tabelle haben Willstätter, Grassmann und Ambros einige Versuche über die Aktivierungen zusammengestellt: Man sieht leicht, dass Papain und Bromelin sich gegen die zwei Aktivatoren qualitativ übereinstimmend verhalten. Auch bei Bromelin findet man die Abhängigkeit der Aktivierung von der Zeit. Bei sehr langen Einwirkungszeiten von HCN sinkt wieder die enzymatische Wirkung, was vielleicht auf Enzymzerstörung beruht.

Enzym	Aktivator	Substrat	ccm $^n/_8$ KOH nach Stunden					Aktivierung in %
			1	4	24	48	96	
Konzentrierter Saft 1	—	Gelatine	0,76	1,16	1,61	1,94	2,40	—
„ „	5 mg HCN	„	0,84	1,48	2,38	2,86	3,58	10—50
„ „	2,8 mg H_2S	„	—	1,12	1,56	1,88	2,26	—
Trockenpräparat 1	—	„	0,56	1,13	1,93	—	—	—
„	3,4 mg H_2S	„	0,71	1,42	2,13	—	—	10—30
„	—	Pepton	0,06	—	0,30	0,42	0,60	—
„	5 mg HCN	„	0,18	0,54	1,06	1,40	2,00	200—230
„	3,4 mg H_2S	„	—	—	1,38	—	2,18	260—300
Rohsaft 4	—	Gelatine	—	2,10	2,74	3,20	—	—
„	5 mg HCN	„	—	2,47	3,45	—	—	18—26
„	3,4 mg H_2S	„	—	2,04	3,17	3,58	3,88	0—16
„	—	Pepton	—	0,54	0,95	1,52	1,90	—
„	5 mg HCN	„	—	0,93	1,97	2,53	2,87	70
„	3,4 mg H_2S	„	—	1,13	2,15	2,75	3,05	80—130
Trockenpräparat 4	—	Gelatine	—	1,72	2,22	2,40	2,82	—
„	5 mg HCN	„	0,76	2,13	3,26	3,80	4,19	20—50
„	—	Pepton	—	0,08	0,49	0,71	1,09	—
„	5 mg HCN	„	—	0,80	1,55	1,99	2,40	120—200

Reaktionsgeschwindigkeit und Enzymmenge. Man findet hier wie bei Papain, dass kleine Enzymmengen eine relativ grössere Wirkung haben, was wohl auf natürliche Hemmungskörper zurückzuführen ist. Willstätter gibt folgende Figur 80.

Die Hemmungskörpertheorie wird durch folgende Beobachtung gestützt.

Beim Altern der Ananassäfte findet man bei annähernder Konstanz der Wirkung auf Pepton fortdauernde Aktivitätsverminderung gegenüber Gelatine. Dies beruht auf der Ausbildung eines spezifischen Hemmungskörpers, denn gealterter Ananassaft wirkt auf die gelatineverdauende Wirkung eines Ananastrockenpräparates stark hemmend.

Aciditätskurve. Optimale Hydrolyse der Gelatine erfolgt im Bereich von pH = 4,5 bis 5,0, übereinstimmend mit dem Maximum der Gelatine-

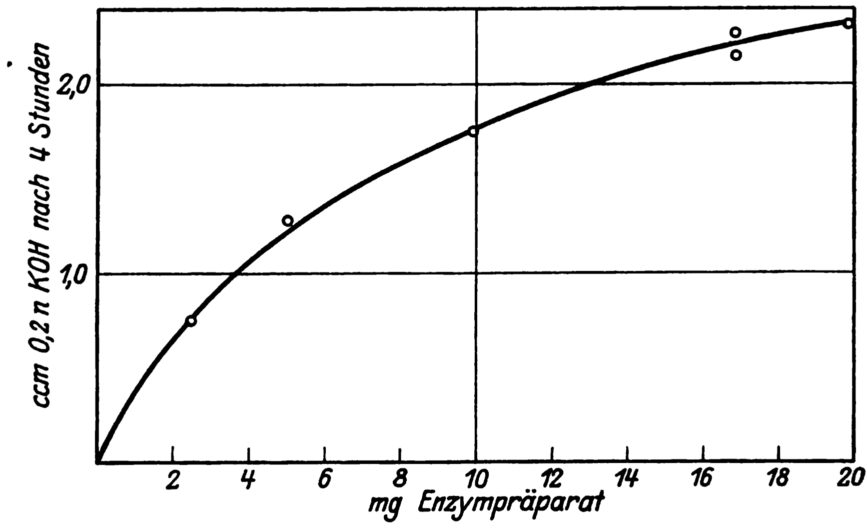


Fig. 80.

spaltung durch Papain und mit dem isoelektrischen Punkt des Substrates. Für das Vorkommen von mehreren Proteasen im Ananassafte geben die Versuche von Willstätter keine Anhaltspunkte.

Für die Spaltung von Albuminpepton erhält man, wie bei Papain, das Optimum auch bei etwa pH = 5.

C. Die Protease aus Cucurbita Pepo[1].

Da nach den neuen Untersuchungen von Willstätter die Protease der Kürbisse ein von Papain und Bromelin ganz abweichendes Verhalten zeigt, werden hier die Arbeiten über dieses Enzym in Kürze besonders referiert.

Material. Am besten geht man von grünhäutigen Früchten mit farblosem Fleisch aus. Ein mittlerer Kürbis von 6 kg Gewicht lieferte in einem Beispiel 2,5 Liter trüben Saft. Um eine genügend starke Wirkung zu erzielen, dampft man den Saft im Vakuum ein. Das Enzym ist in der Rohlösung unter Toluol monatelang haltbar. Eine Fällung mit Alkohol gelingt hier nicht, da dabei alles Enzym zerstört wird. Mit Ammonsulfat kann eine enzym-

[1] Willstätter, Grassmann und Ambros, H. 151, 303; 1926 und 151, 315; 1926 und 152, 172; 1926.

haltige Fällung erzeugt werden, die, in Wasser gelöst, ein aktive Enzymlösung gibt, die durch Dialyse weiter gereinigt werden kann.

Verhalten gegen Cyanwasserstoff. Im Gegensatz zum Papain wird die Kürbisprotease von HCN und H_2S stark gehemmt. Als Beispiel führen wir eine Tabelle von Willstätter an.

Versuchsdauer	1	2	8 Tage
Ohne Zusatz	1,97	3,09	5,58 ccm $n/_5$ KOH
Mit HCN 10 mg	1,30	1,91	5,50 „ „ „
Mit H_2S 5 mg	1,04	1,14	2,99 „ „ „

Die sehr starke Abweichung der Kürbisprotease vom Papain zeigt sich ausserdem in den Aciditätskurven bei Spaltung verschiedener Substrate.

Aciditätskurven.

Nach Fermi und Buscaglioni[1] soll die Protease von Cucurbita am besten in neutraler Lösung wirken (Gelatinespaltung). Dies wurde von Willstätter bestätigt:

pH der Lösung		Spaltung
Beginn	Ende	ccm $n/_5$ KOH
4,3	4,5	1,5
5,0	5,2	2,5
5,4	5,5	3,3
6,6	6,5	3,8
7,0	6,7	4,2
8,0 Kontrolle mit gekochtem Enzym		0,3

Die Spaltung des Albuminpeptons zeigt dagegen bei pH = 6,3 ein schmales Optimum mit steilem Abfall der Kurve nach beiden Seiten hin.

Während also in den jetzt beschriebenen Fällen die Kürbisprotease von dem Papain stark abweicht, zeigt sie bei der Fibrinauflösung dasselbe Optimum bei etwa 7,4. Es handelt sich indessen hier um ein festes Substrat, und es ist möglich, dass hier Sorption oder Bindung des Enzyms an der Eiweissoberfläche und ähnliche Umstände die Aktivitätskurve mitbestimmen. Fest steht jedenfalls, dass die Kürbisprotease in mancher Hinsicht von dem Papain abweicht, so dass man mit Willstätter annehmen kann, dass sie zwei verschiedene Enzyme sind und dass die Verschiedenheiten nicht durch Hemmungskörper und dgl. vorgetäuscht werden. Bemerkenswert ist, dass die Kürbisprotease Aktivitätsoptima zeigt, die weder mit dem isoelektrischen Punkte der Substrate, noch mit dem Gebiet maximaler Salzbildung nach Northrop zusammenfallen.

[1] Fermi und Buscaglioni, Zbl. f. Bakt. 5, 24; 1899.

Sorptionsverhalten. Im Gegensatz zu Papain wird die Kürbisprotease durch Tonerde aus saurer Lösung leicht, aus ammoniakalischer schlecht adsorbiert. Bei Sorptionsversuchen mit Tonerde konnten keine Verschiebungen in der Wirksamkeit der Lösungen gegenüber verschiedenen Substraten beobachtet werden.

D. Andere Proteasen in Säften und Früchten.

Marcano[1], der zuerst die Eiweissverdauung durch Ananassaft untersucht hat, fand auch in vielen anderen Früchten ähnliche Wirkung. Schon früher hatte er gefunden, dass der ausgepresste Saft der Blätter einiger Arten von Agave imstande war, Fleisch zu verdauen. Die recht schwache Wirkung des Agavesaftes wurde von Chloroform nicht gehemmt und war bei etwa 40° am grössten.

Wittmack[2] und Bouchut[3] fanden eine Protease im Milchsaft von Ficus carica. Die Angaben von Bouchut über die Eiweissverdauung wurden von Hansen[4] bestätigt. Hansen fand das Enzym am besten in schwach saurer Lösung wirksam, auch in einer alkalischen Flüssigkeit war es nicht ganz wirkungslos. Nach Mussi[5] dagegen ist es in neutraler Lösung wirkungslos. Mussi fällte das Enzym aus dem Safte mit Alkohol. Nach Gerber[6] hemmen H_2O_2, $HgCl_2$, Jod.

Im Saft vom Kachree-Kürbis (Cucumis utilissimus) fand Green[7] eine Protease, die koaguliertes Eieralbumin langsam löste. Am wirksamsten war sie in alkalischer Lösung, schwächer in neutraler, noch schwächer in saurer.

Eine Protease in Anagallis fanden Daccomo und Tommasi[8]. Die Existenz dieses Enzymes wird aber von Bufalini bestritten[9].

Mohnsaft soll nach Annett[10] eine Protease enthalten.

In reifen Weintrauben soll nach Pantanelli[11] eine eigentümliche Protease vorkommen, die bei saurer Reaktion das eigene Eiweiss autolytisch angreift.

Eine Protease in Bananen beschreibt Bailey[12].

---

[1] Marcano, C. r. 99, 811; 1884 und 107, 117; 1888. — Bull of Pharmacy 5. 213; 1884.
[2] Wittmack, Vers. d. d. Naturf. und Ärzte 1879; 222.
[3] Bouchut, C. r. 91, 67; 1880.
[4] Hansen, Arb. Bot. Inst. Würzburg, 3, 265.
[5] Mussi, Ref. in Pharm. Jl 3 ser. 21, 560; 1890/91.
[6] Gerber, Soc. Biol. 74, 1336; 1913.
[7] Green, Ann. of Botany, 6, 195; 1892.
[8] Daccomo und Tommasi, Rev. de Therap. 59, 470.
[9] Bufalini, Biochem. Zbl. 10, 1886.
[10] Annett, Biochem, Jl 16, 765; 1922.
[11] Pantanelli, Zbl. f. Bakt. 31, 545; 1912 und 42, 480; 1914.
[12] Bailey, Jl Amer. Chem. Soc. 34, 1706; 1912.

E. Proteasen der Samen.

Die Proteasen der Samen einiger Pflanzen sind recht gut untersucht, teilweise mit moderner Methodik. Über die Proteasen der übrigen Gewebe dagegen sind unsere Kenntnisse sehr lückenhaft. Teils wurde die Autolyse der verschiedenen Teile untersucht [1], teils wurde in einigen Fällen die Spaltung zugesetzter Eiweissstoffe gemessen [2]. Proteasen kommen in allen Geweben vor und in jedem Wachstumsstadium der Pflanze. Aus den wenigen einwandfreien Arbeiten scheint hervorzugehen, dass Peptidasen vorkommen neben einer Pepsinase, wogegen eine Tryptase zu fehlen scheint. Anzunehmen ist wohl, dass es sich auch hier um Enzyme vom Typus des Papains oder des Kürbisenzyms handelt.

Die Proteasen der Samen werden bei der Keimung in Tätigkeit gesetzt. Deshalb sind eigentlich nur keimende Samen untersucht worden. Entdeckt wurde zuerst eine Protease in den Samen der Wicke von Gorup-Besanez [3]. Die Protease fand er dann in den Samen des Hanfes, des Flachses und der Gerste. Er gibt an, dass das Enzym Fibrin in Peptone zu verwandeln vermag, worauf eine deutliche Biuretreaktion des Filtrates hindeutet. Er stellte auch fest, dass unter gewissen Bedingungen in den Schoten ganz junger Wickenpflanzen grosse Mengen Leucin und Asparagin nachgewiesen werden können.

Die Protease der Samen von Lupinus hirsutus untersuchte Green [4]. Sie ist in schwach saurer Lösung gegen Fibrin wirksam. Ein ähnliches Enzym fand er in den Samen von Ricinus communis.

Neumeister [5] fand derartige Enzyme in anderen Samen, so von Gerste, Mohn, Raps, Mais und Weizen. Aus den Extrakten sorbierte er das Enzym durch Fibrin. Wurden dann die Fibrinflocken in eine schwach saure Lösung gebracht, so trat Verdauung ein. Neumeister fand das Enzym nur in schwach saurer Lösung wirksam. Die Säure soll nach ihm eine organische sein, Mineralsäuren zerstören das Enzym.

Über Proteasen in Mehl siehe Swanson [6]. Eine Untersuchung über die Proteasen in Weizen haben Sharp und Elmer ausgeführt [7].

Proteasen des Malzes.

Grosses Interesse haben wegen der praktischen Verwendung die Proteasen des Malzes. Sie wurden in Malzextrakte von Fernbach und Hubert

[1] Palladin und Mitarbeiter, Biochem Zs 39, 290; 42, 325; 1912; 44, 318; 1912.
[2] E. A. Fisher, Biochem. Jl 13, 124; 1919.
[3] v. Gorup-Besanez, Chem. Ber. 7, 1478; 1874 und 8, 1510; 1875.
[4] Green, Ann. of Bot. 7, 112; Proc. Roy. Soc. 48, 370.
[5] Neumeister, Zs Biol. 30, 447; 1894.
[6] Swanson und Tague, Jl Amer. Chem. Soc. 8, 1098; 1916.
[7] Sharp und Elmer, Cereal Chemistry, 1, 83, 1924.

gefunden[1]. Reinigungsversuche sind kaum vorgenommen worden. Aus Malzextrakten kann das Enzym durch Alkohol gefällt werden. Durch Glycerin kann man das Enzym auch extrahieren.

In der rohen Gerste kommt nach Windisch und Schellhorn[2], denen wir eine umfassende Untersuchung verdanken, dasselbe, oder ein ähnliches Enzym vor. In schlecht geernteten oder eiweissreichen Gersten kann das Enzym in beträchtlicher Menge vorkommen. Beim Beginn der Keimung tritt eine starke Vermehrung ein, die dann bis zum Grünwerden der Pflanze weitergeht.

Temperatur. Nach Fernbach, dessen Resultate von Windisch bestätigt wurden, beeinträchtigen Temperaturen unter 60° das Enzym kaum. Bei 70° tritt schnelle Zerstörung ein. Wahl[3] fand dagegen das Temperaturoptimum bei etwa 30°, Adler[4] bei 46°. Durch den Darrprozess wird das Enzym geschwächt, aber nicht vollkommen zerstört.

Substrate. Nach mehreren Autoren sollen die Samenenzyme in der Hinsicht spezifisch sein, dass sie das eigene Eiweiss schneller oder vollständiger abbauen.

Auf zugesetzte Eiweissstoffe wirken sie im allgemeinen schwach. Gelatine und Edestin werden einigermassen leicht gespalten. Eieralbumin wird nach Lundin[5] nicht gespalten. Die pflanzlichen Eiweisse werden im allgemeinen leichter angegriffen als die tierischen. Serumeiweiss wird nicht hydrolysiert, denaturiertes soll langsam gelöst werden. Feste Eiweissstoffe werden nur schwer gelöst.

Aciditätsbedingungen.

a) Die Autolyse. Windisch[2] gibt an, dass die Protease auf das durch den Keimprozess gelöste Eiweiss am besten in schwach saurer Lösung wirkt. Zusatz von organischen Säuren in kleinen Mengen wirkte fördernd. Fernbach[6] fand die Reaktion des primären Phosphates am günstigsten. Ein Optimum bei $pH = 5{,}8$ fand Schjerning[7]. Mit modernerer Methodik ermittelte Adler das Aktivitätsoptimum bei 4,5—5,0. Unter Anwendung der Formoltitration hat dann Lundin das Optimum der Malzautolyse bestimmt. Aus seiner folgenden Fig. 81 findet man das Optimum bei $pH = 4{,}5$. Die Kurven, welche die Abhängigkeit der Formolstickstoffbildung von der Zeit veranschaulichen, verlaufen recht geradlinig, was darauf hindeutet, dass die in den Versuchen von Lundin gebildeten Abbauprodukte noch nicht er-

[1] Fernbach und Hubert, C. r. 130, 1783; 1900.
[2] Windisch und Schellhorn, Woch. f. Brau. 1900, S. 334.
[3] Wahl, Internat. Kongr. angew. Chem. 1912, 14, 215.
[4] Adler, Zs ges. Brauwesen, 38, 17; 1915.
[5] Lundin, Biochem. Zs 131, 193; 1922.
[6] Fernbach, C. r. 131, 293; 1901.
[7] Schjerning, C. r. Trav. de Carlsberg 6, 225; 1906; 8, 169; 1910; 11, 45; 1914.

heblich hemmen. Dass Anhäufung von Abbauprodukten in der Lösung die weitere Tätigkeit des Enzyms vermindert, stellte schon Windisch fest.

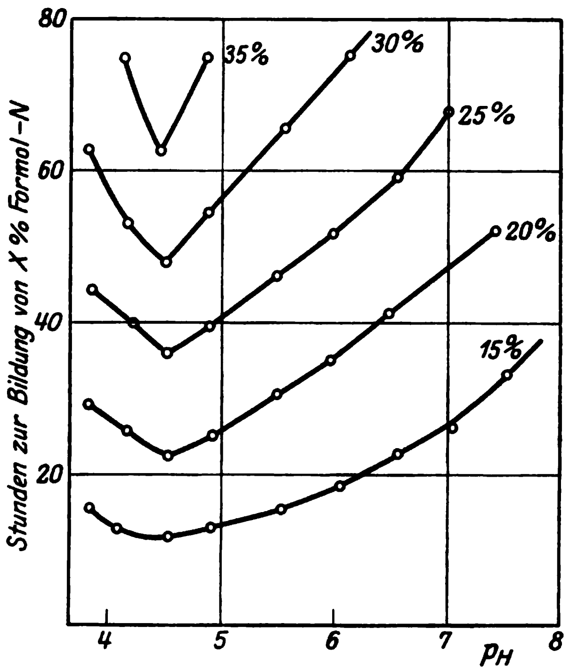


Fig. 81.

Lundin hat weiter den Reaktionsverlauf bei verschiedenen Aciditäten verfolgt und die verschiedenen Abbauprodukte bestimmt. Wir führen eine Tabelle an:

pH	Autolysezeit Stunden	Total-N im Filtrat	Albumin-N	Peptid-N	Amino-N	Ammoniak-N	Amino-N + Ammoniak-N
	18	42,8	4,5	29,3	9,0	0	9,0
3,1	100	50,6	0,5	28,5	20,6	1,0	21,6
	200	53,4	0,9	28,0	23,5	1,0	24,5
	18	57,3	3,5	29,3	24,6	0	24,6
4,4	100	71,6	3,5	27,8	39,3	1,0	40,3
	200	74,7	4,2?	26,1	41,3	2,5	43,8
	18	42,8	5,3	27,0	10,5	0	10,5
6,8—7,1	100	54,3	4,2	22,5	25,6	2,0	27,6
	200	55,7	5,6	16,9	29,2	4,0	33,2

Bei Betrachtung der Versuche 1 und 3, wo der totale Stickstoffgehalt des Filtrates ungefähr gleich ist, findet man einen beträchtlichen Unterschied im Verlauf der Autolyse. Bei der Autolyse in saurer Lösung nimmt der

Albuminstickstoff rasch gegen 0 ab, während er sich im Versuch 3 in neutraler Lösung während der ganzen Zeit etwa konstant hält. Betreffs des Peptidstickstoffes sind die Verhältnisse gerade umgekehrt, und beim Aminostickstoff steigen in beiden Versuchen die Werte; im Versuch 3 jedoch viel schneller. Lundin schliesst, dass in saurer Lösung eine Pepsinase arbeitet, welche die Eiweissstoffe in peptonähnliche Stoffe spaltet, während in neutraler Lösung hauptsächlich ein (trypsin- oder) erepsinähnliches Enzym wirksam ist.

b) Die Autolyse der Keimlinge. Bei entsprechenden Versuchen mit Malzkeimlingen kam Lundin zu dem auffallenden Resultat, dass es hier kein Enzym gibt, das in einigermassen saurer Lösung wirkt. Bei pH = 6

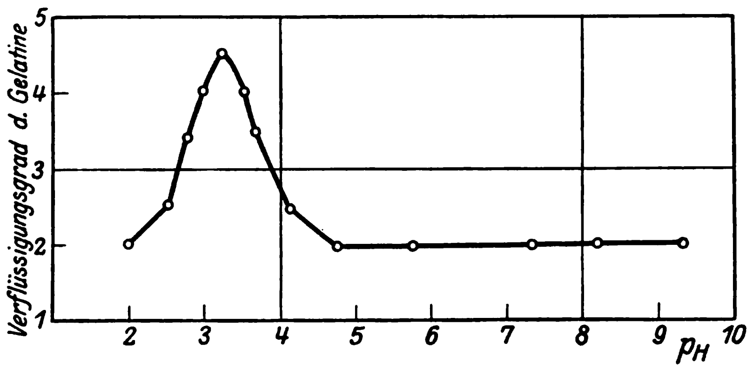


Fig. 82.

wurden dagegen die Eiweissstoffe gespalten. Lundin schliesst also auf ein trypsinähnliches Enzym. Vielleicht ist es richtiger, ein Enzym vom Papaintypus anzunehmen.

c) Die Wirkung der im Malz und in Keimlingen vorkommenden Proteasen hat nun Lundin näher untersucht. Er hat sie mit Substraten von verschiedenem Hydrolysegrad reagieren lassen und die Aciditätskurven ermittelt.

d) Die „Malzpeptase“, wohl besser Malzpepsinase genannt. (Für die Namen kann man einstweilen keine rationellen Vorschläge machen, da sowohl diese wie viele andere tierische und pflanzliche Proteasen noch zu wenig bekannt sind.)

Dieses Enzym des Grünmalzes wurde auf Thymolgelatine nach Palitzsch und Walbum[1] und nach Dernby[2] geprüft. Es wurde eine Aciditätskurve mit dem Optimum bei pH = 3,5 (Fig. 82) gefunden. Mit fertigem Pilsner Malz wurde eine Aciditätskurve mit dem Optimum bei 3,7—4,4 ermittelt.

Salze, welche die Acidität nicht verändern, haben eine sehr unbedeutende Wirkung.

[1] Palitzsch und Walbum, Biochem. Zs 17, 1; 1912.
[2] Dernby, Biochem. Zs 81, 107, u. zw. 138; 1917.

Durch die Malzpeptase werden Eieralbumin und daraus hergestelltes Acidalbumin nicht angegriffen.

e) Die Malztryptase[1]. Die tryptische Wirkung wurde durch Versuche über die Spaltung von Wittepepton gemessen. In einer Anzahl Versuche wurde ein recht breites Optimum zwischen 5 und 6 gefunden. Das Enzym dürfte keine echte Tryptase sein, vielmehr kann man an ein papainähnliches Enzym denken. Die neuen Versuche von Willstätter über die Hefenprotease haben gezeigt, dass sie zu jener Gruppe gehört. Ob nun, wie Lundin glaubt, eine Pepsinase vorkommt, dürfte nach den Willstätterschen Arbeiten etwas zweifelhaft sein, da die Gelatineverflüssigungsmethode für die in Rede stehende Entscheidung nicht ganz einwandfrei ist.

f) Malzkeimtryptase. Die Protease der Keimlinge wurde sowohl nach der Gelatinemethode, wie durch Peptonspaltung untersucht. In beiden Fällen wurde die optimale Aciditätszone 6,3—7,2 erhalten. Im letzten Falle war die optimale Zone schmäler. Hier dürften wir sicher eine Protease vom Papaintypus vor uns haben.

Bei der Peptonspaltung verläuft die Formolstickstoffbildung während des ersten Drittels der Reaktion der Zeit angenähert proportional. Auch hier sind wirkliche Neutralsalze von unbedeutendem Einfluss.

Proteasen der carnivoren Pflanzen[2].

Die bisher besprochenen Pflanzenproteasen arbeiten intracellular. Man findet jedoch im Pflanzenreich unzweifelhaft Fälle, wo eine wahre Sekretion von eiweissverdauenden Säften auf der Oberfläche der Pflanze, oder in besonderen Behältern stattfindet. Bei diesen Pflanzen findet man also einen Verdauungsprozess, der dem der Tiere ähnlich ist. Die sogenannten insektenfressenden Pflanzen fangen nach verschiedenen Methoden Insekten, töten sie und verdauen sie. Da über die einzelnen Enzyme nur weniges bekannt ist, beschreiben wir sie für die wichtigsten in Betracht kommenden Pflanzen:

Nepenthes, Sarracenia, Darlingtonia. Bei diesen Pflanzen werden gewisse Blätter ganz oder teilweise in Kannen verwandelt, die eine Flüssigkeit enthalten, worein die Insekten getaucht werden. Die zwei letztgenannten Pflanzen dürften in den Kannen nur Wasser haben. Die hineingelangten Insekten sterben, faulen und werden resorbiert. Im Falle von Nepenthes ist die Frage, ob sezernierte Proteasen vorkommen, strittig. Hooker[3] konstatierte zuerst die eiweissverdauende Wirkung der Flüssigkeit, hat jedoch

[1] Unter den älteren Arbeiten seien noch diejenigen von Weiss (Proteolyt. Enzyme, Kopenhagen 1902), von Windisch und Schellhorn (Woch. Brau. 17, 29; 1900), sowie von Fernbach und Hubert (C. r. 139, 293 u. 1783; 1900) erwähnt.

[2] Ältere zusammenfassende Darstellungen geben J. Reynolds Green, der sich auch selbst mit Pflanzenproteasen beschäftigt hat (Ann. of Bot. 1892) und Effront (Les Catalyseurs Biochemiques, Paris 1914).

[3] Hooker, Brit. Assoc. Reports. 1874 (Belfast) 102.

darauf hingewiesen, dass sie auf anwesenden Bakterien beruhen kann. Tatsächlich besitzt aber Nepenthes in den Kannen eine Art Drüsen. Aus der Kannenflüssigkeit gewann Lawson Tait ein unreines Enzympräparat[1]. Gorup-Besanez[2] fand, dass die ruhenden Kannen einen nur wenig aktiven Saft absonderten; wurden sie dagegen mit verdaulichem Material gereizt, so wurde ein saurer, stark aktiver Saft sezerniert. Er fand, dass der Saft Fibrin löst. Zu ähnlichen Resultaten kamen auch Vines[3] und Hansen[4], zu einem entgegengesetzten Ergebnis gelangten Dubois[5] und Tischutkin[6]; sie schreiben die Spaltung den Bakterienwirkungen zu. Dahin äussert sich auch neuerdings Franca[7]; die Enzymtheorie stützen dagegen Goebel[8], sowie Abderhalden und Teruuchi[9]. Es ist möglich, dass das Alter der Kanne und andere ähnliche Umstände grosse Verschiedenheiten bedingen können.

Utricularia. Die Pflanze trägt Bläschen, welche mit einer Vorrichtung versehen sind, die den Eintritt kleiner Wassertiere erlauben, den Austritt aber verhindern. Ob in den Bläschen ein sezerniertes Enzym vorkommt, ist zweifelhaft. Ein tryptisches Enzym wollte Luetzelburg nachgewiesen haben[10]; nach seiner Methode kann das gefundene Enzym aus den Geweben stammen. Dasselbe gilt von den neueren Versuchen von Adowa[11]. Da Adowa indessen mehr Protease in den Extrakten der Bläschen fand als in den Extrakten anderer Teile der Pflanze, ist es immerhin möglich, dass die Blasen Enzyme absondern.

Drosera. Darwin[12] untersuchte die Blätter der Drosera sehr genau. Die Blätter besitzen Drüsen, welche nach Anreiz mit verdaulicher Substanz einen sauren Saft absondern. Fällt ein Insekt auf das Blatt, so biegen sich die gestielten Drüsen darüber, und der Saft löst die verdaulichen Teile. Nach Darwin werden ausser gewöhnlichem Eiweiss auch Bindegewebe und Knorpel gelöst. Legt man unverdauliche Substanz auf ein Blatt, so wird nur wenig Saft sezerniert. Morren[13] zeigte dann, dass eine Bakterienwirkung ausgeschlossen ist. Rees und Will[14] sahen in dem Droseraenzym eine Pepsinase,

---

[1] Lawson Tait, Nature, 1251; 1875.
[2] v. Gorup-Besanez, Chem. Ber. 9, 673; 1876.
[3] Vines, Jl of anat. Phys. 11, 124; 1877.
[4] Hansen, Arb. Bot. Inst. Würzburg, 3, 265.
[5] Dubois, C. r. 111, 315; 1890.
[6] Tischutkin, Ref. in Bot. Zbl. 50, 304; 1892 und 53, 322; 1893.
[7] Franca, Riv. de Biol. 6, 161. — Ber. Phys. 27, 320; 1924.
[8] Goebel, Pflanzenbiol. Schilderungen 11, 186; 1893.
[9] Abderhalden und Teruuchi, H. 49, 20; 1906.
[10] v. Luetzelburg, Flora 100, 145; 1910.
[11] Adowa, Biochem. Zs 150, 101 und 153, 506; 1924.
[12] Darwin, Insektivorous plants. London 1888.
[13] Morren, Acad. Scienc. Belgique 39, 870; 40, 6, 525, 1040; 42, 1019.
[14] Rees und Will, Bot. Zs 1875 (29. Okt.).

ebenso White[1]. Eine moderne Untersuchung verdanken wir Dernby[2] (Formolmethode und Fällung mit Stannochlorid nach Schjerning). Er fand, dass Acidalbumin bei einer Acidität von etwa pH = 5 optimal gelöst wurde. In alkalischer Lösung konnte keine Spaltung von Milcheiweiss beobachtet werden. Peptidasen wurden nicht gefunden.

Nach Franca sezerniert auch Drosophyllum Enzyme.

Dionaea. Darwin untersuchte auch Dionaea und fand ähnliche Verhältnisse wie bei Drosera. Er dachte auch hier an Bakterienwirkung, und die Entscheidung dürfte noch etwas zweifelhaft sein.

Pinguicula. Die Blätter der Pinguicula scheiden an den Rändern der Oberfläche eine Verdauungsflüssigkeit aus. Dernby hat die Proteasen des Blattpresssaftes untersucht. Er fand ein Enzym, das bei neutraler und schwach alkalischer Reaktion das Milchcasein abbaut. Die optimale Wasserstoffionenkonzentration war etwa pH = 8. Keine peptischen (ereptischen) Enzyme konnten nachgewiesen werden[3].

---

[1] White, Proc. Roy. Soc. 83, 134; 1910.
[2] Dernby, Biochem. Zs 78, 197; 1916.
[3] Dernby, Biochem. Zs 80, 152; 1917.

23. Kapitel.

Proteasen der Pilze, Hefen und Bakterien.

Über die proteolytischen Enzyme der höheren Kryptogamen besitzen wir nur wenige Untersuchungen. Noch geringer ist natürlich die Zahl der Arbeiten, in denen moderne Methoden zur Anwendung gekommen sind. Dass Proteasen in den höheren Pilzen auftreten, geht aus vielen Untersuchungen hervor. Über die Anzahl der Enzyme und deren Wirkungsbedingungen geben indessen die Arbeiten wenig Auskunft. Dass bei schwach saurer Reaktion optimal wirkende „Pepsinasen“ vorkommen, ist sicher. Dass ausserdem noch tryptische Enzyme z. B. bei der Autolyse mitwirken, ist wohl wahrscheinlich, aber nicht bewiesen. Angaben über Proteasen bei höheren Pilzen finden wir bei Hjort[1], Bourquelot und Hérissey[2], Delezenne und Mouton[3] und bei Zellner[4]. Peptone, Gelatine und Casein werden gespalten, nach Vines[5] auch Fibrin. Die Spaltung von Hühnereiweiss haben mit moderner Methodik (pH = 4,5) Melin und Helleberg verfolgt[6]. Kikkoji[7] hat in Cortinellus Edodes eine Protease gefunden, die am besten in neutraler oder schwach saurer Lösung wirken soll.

Bei Schimmelpilzen kommen ebenfalls Proteasen vor[8], die nach alten Angaben in saurer Lösung am besten spalten sollen[9]. Vines gibt an, dass eine Protease in Aspergillus oryzae am besten in schwach alkalischer Lösung wirkt. Oshima und Hoshi[10] haben die Proteasen des Aspergillus Ochraceus untersucht und sie denen des A. oryzae recht ähnlich gefunden. Casein, Eieralbumin, Protein von Scomber Japonicus und Wittepepton wurden gespalten. Aminosäuren wurden reichlich gefunden. Über die Aciditätsbedingungen machen sie folgende Angaben:

---

[1] Hjort, Zbl. f. Physiol. 10, 192; 1896.
[2] Bourquelot und Hérissey, C. r. 127, 566; 1898.
[3] Delezenne und Mouton, C. r. 136, 167 und 633; 1903.
[4] Zellner, Chemie der höheren Pilze. Leipzig 1907.
[5] Vines, Ann. Bot. 17, 237; 1903.
[6] Melin und Helleberg, Biochem. Zs 157, 146; 1925.
[7] Kikkoji, H. 51, 201; 1907.
[8] Malfitano, Ann. Inst. Pasteur 14, 60; 1900. — Saito, Biochem. Zbl. 2, 1370; 1904.
[9] Schäffer, Fermente in Schimmelpilzen. Diss. Erlangen 1900.
[10] Oshima und Hoshi, Jl Soc. Agricult. Forestry. Sapporo, Japan 16, 483; 1925.

Wittepepton: Aminosäurebildung bei 40° Optimum bei pH = 5,1
Casein: „ „ „ „ = 6,1
„ Verflüssigung bei 40° „ „ „ = 7,4

Die Protease des A. oryzae hat ihr Optimum bei etwa 5 (Okada[1]).

Die Proteasen der Strahlenpilze haben Näslund und Dernby[2] untersucht.

Proteasen der Hefen.

Die Autolyse der Hefe wie die der tierischen Organe wurde von Pasteur, Duclaux, Schützenberger, Salkowski und anderen untersucht[3]. Hahn und Geret zeigten danach, dass der Buchnersche Presssaft die Fähigkeit

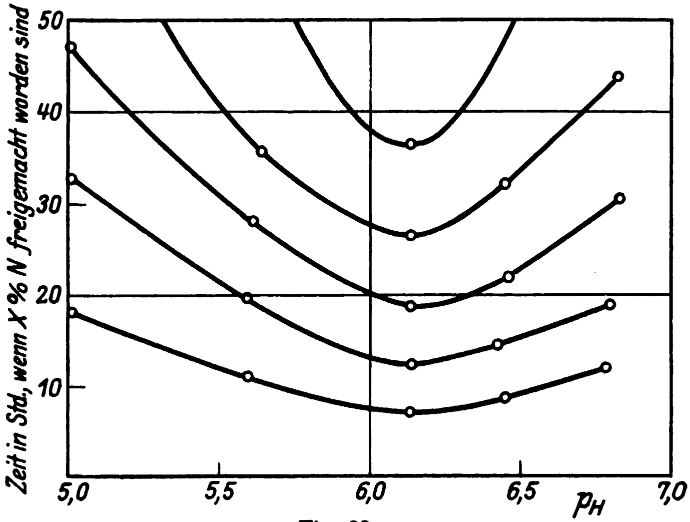


Fig. 83.

besitzt Eiweissstoffe wie Fibrin, Eieralbumin usw. zu spalten[4]. Hahn nannte das proteolytische Enzym Endotryptase, welcher Name andeuten soll, dass das Enzym während des Lebens der Zelle nicht austreten kann. Das Enzym wirkt in schwach saurer Lösung; auch tiefe Spaltprodukte entstehen. Die sog. Endotryptase wurde dann von vielen Autoren untersucht und speziell wurden durch ihre Arbeiten die Bausteine des Hefeneiweisses gut bekannt. Alle diese Untersuchungen nehmen die Existenz nur eines Enzymes an. Der erste, der die Annahme von mehreren Proteasen in der Hefe gemacht hat, ist Vines[5]: „Die zwei Verdauungs-Prozesse, nämlich die Auf-

[1] Okada, Biochem. Jl 10, 130; 1916.
[2] Näslund und Dernby, Biochem. Zs 138, 497; 1923.
[3] Pasteur, Ann. de Chim. Phys. 58, 401. — Duclaux, Thèse de Paris 1865, 44. — Schützenberger, Intern. wiss. Bibl. 1875. — Salkowski, H. 13, 506; 1889.
[4] Hahn und Geret, Zs Biol. 40, 117; 1900. — Siehe auch Martin Hahn, Chem. Ber. 31, 200; 1898.
[5] Vines, Ann. of Bot. 18, 289; 1904 und 23, 1; 1909.

lösung von Fibrinflocken und die Spaltung von Wittepepton werden nicht von derselben Protease bewirkt. Vielmehr zeigen die Resultate dieser Arbeit das Vorhandensein von zwei verschiedenen Proteasen an: die eine im Wasser leicht löslich, wirkt nur peptolytisch, die andere, im Wasser weniger, aber in 2% NaCl-Lösung leicht löslich wirkt nur peptonisierend.“ Die grosse Verwirrung in der älteren Literatur beruht, wie Dernby hervorhebt, auf dem Umstande, dass man nicht untersucht hat, wie viele Enzyme bei der Hefenautolyse wirklich beteiligt sind und nicht den Zusammenhang ermittelt hat zwischen dem Autolysenvorgang und der Wasserstoffionenkonzentration. Durch die Untersuchungen von Dernby[1] und von Iwanoff[2] wurden über die Hefenproteasen viele neue Ergebnisse gewonnen.

Was zuerst die Hefenautolyse betrifft, so bestätigt Dernby die alten Angaben, dass sie nur in schwach saurer Lösung erfolgt, zwischen den Grenzen pH = 4—7. Er verfolgte die Zunahme des Aminostickstoffs, und gibt Figur 83 an.

Dernby hat die verschiedenen Abbauprodukte bei verschieden Aciditäten bestimmt: 500 g Hefe + HCl + NaOH + Wasser = 500 ccm. Dauer 216 Stunden bei 37°. In der Tabelle findet man die Verteilung des Stickstoffs zwischen den verschiedenen Produkten.

pH bei der Autolyse	Stickstoff %				
	Total-N im Filtrat	Eiweiss-N	Peptid-N	Amino-N	Ammoniak-N
6,9—7,2	50,7	19,6	4,5	22,4	4,2
6,0—6,8	89,5	18,7	6,0	51,1	13,7
3,9—3,9	48,7	1,9	32,0	14,1	0,7

Aus diesen Resultaten schliesst Dernby im Anschluss an die Auffassung von Vines, dass bei der Hefenautolyse mindestens zwei Enzyme wirksam sind, nämlich eine in saurer Lösung wirksame Pepsinase, welche die Eiweissstoffe in peptonartige Stoffe zerlegt und eine in alkalischer Lösung wirkende Tryptase, welche die Peptone weiter abbaut. Durch weitere Versuche wollte Dernby folgende proteolytische Enzyme in der Hefe unterscheiden:

Ein „Hefepepsin“ (Pepsinase), welches genuine Eiweissstoffe zu Peptonen aber nicht weiter spaltet. pH-Optimum bei etwa 4,5—5;

eine Hefetryptase, welche nicht Eieralbumin und Hefeneiweiss, wohl aber Gelatine, Casein und Wittepepton spaltet. Das Enzym vermag nicht, diese Stoffe vollständig zu Aminosäuren abzubauen. pH-Optimum bei 7,0;

[1] Dernby, Biochem. Zs 81, 107; 1917.

[2] N. N. Iwanoff, Biochem. Zs 58, 217; 1913. — 63, 359; 1914. — 120, 1; 1920. — Zs f. Gärungsphysiol. 1, 230; 1913. — Siehe auch drei ältere Arbeiten von Butkewitsch, Gromow (H. 42) und Grigorjew (H. 42).

eine Hefeereptase, die dem Darmerepsin ähnlich ist und einfache Peptide in Aminosäuren spaltet.

„Die Autolyse der Hefe ist ein Verdauungsprozess, der von den Enzymen Hefepepsin, Tryptase und Ereptase bewirkt wird und kann nur bei solchen Wasserstoffionenkonzentrationen vor sich gehen, wenn diese Enzyme gleichzeitig wirken können.“ Dernby gibt untenstehende orientierende Figur 84 (t ist eine Zeit gleichen Umsatzes).

Ganz andere Auffassungen über die Proteasen der Hefen vertreten in einer neuen Untersuchung Willstätter und Grassmann[1]. Wie sie früher im Falle von Papain zeigen konnten, dass die Ansichten von Vines über mehrere Proteasen nicht haltbar sind, so fanden sie auch hier, dass dasselbe

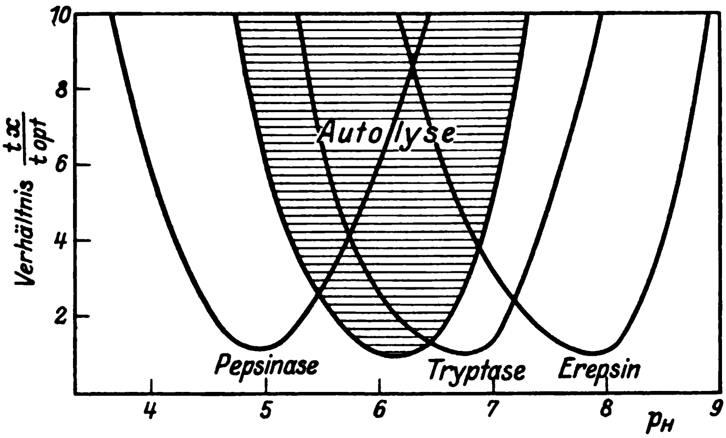


Fig. 84.

Enzym der Hefe sowohl Eiweiss zu peptonisieren als die Peptone weiterzuspalten vermag. Mit anderen Worten: Nach Willstätter und Grassmann haben wir in der Hefe ausser der Peptidase (dem Hefenerepsin) nur eine Protease, die wie das Papain und die Ananasprotease ein pH-Optimum bei 5—6 hat. Sie wird durch Blausäure nicht aktiviert. Dieses Enzym dürfte mit dem „Hefepepsin“ Dernbys zu identifizieren sein. Allerdings hat Dernby das Optimum in ein wenig saurerer Lösung gefunden, was Willstätter und Grassmann auf die Versuchsmethodik Dernbys zurückführen.

Dernby hat das pH-Optimum der Gelatineverflüssigung und der Spaltung von Acidalbumin untersucht. Mit steigender Temperatur verschiebt sich das Optimum, aber nur wenig, gegen die saure Seite. Für verschiedene Substrate ist das Optimum nicht ganz dasselbe. Für Acidalbumin fand Dernby etwa pH = 4,8, für Gelatine etwa 4,3. Neutralsalze in Konzentrationen kleiner als etwa 1 n sind beinahe wirkungslos. Natriumsulfat, Kaliumnitrat und Kaliumbromid hemmen ein wenig und deutlich mehr als andere untersuchte Salze.

[1] Willstätter und Grassmann, H. 153, 250; 1926.

Eine Hefentryptase tritt nach Dernby bei der Verdauung von Acidalbumin und Hefeneiweiss in den ersten Stufen der Reaktion nicht in Wirksamkeit. Bei der Verflüssigung der Gelatine dagegen erhielt er zwei pH-Optima, wovon das saure von der Pepsinase und das alkalische von der Tryptase herrühren soll. Dernby gibt folgende Figur 85.

Das dritte Maximum bei pH = 9 dürfte auf der Wirkung des Alkalis beruhen. Die Wirkung der Hefentryptase auf Thymolgelatine geht nach Dernby viel tiefer als die der Pepsinase. Dabei wirkt natürlich die Ereptase teilweise mit. Dernby hat auch die Spaltung des Wittepeptons untersucht und auch hier das Optimum bei pH = etwa 7 gefunden. Das Spaltungsoptimum des Caseins liegt auch bei etwa 7.

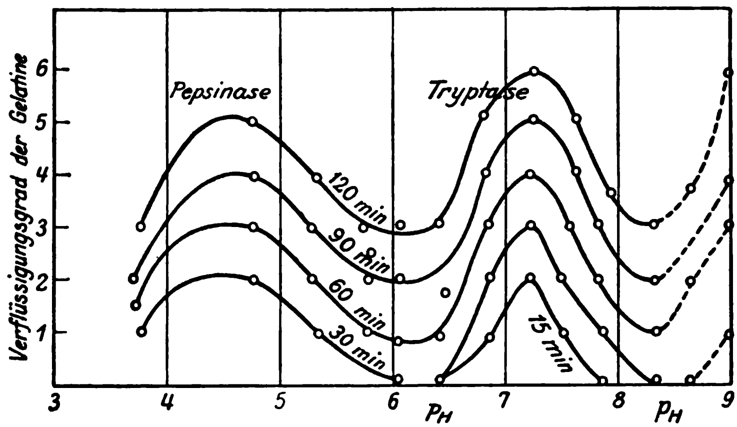


Fig. 85.

Neutralsalze haben auch hier einen nur geringen Einfluss.

Im Gegensatz zu Dernby finden nun Willstätter und Grassmann bei der Gelatinespaltung nur ein Optimum, und zwar unter Anwendung der einwandfreien Bestimmungsmethode von Waldschmidt-Leitz, wo doch nur die Gesamthydrolyse gemessen wurde. Dasselbe Optimum fanden sie für die Spaltung des Albuminpeptons (Merck). Das Optimum wurde bei verschiedenen Enzymproben nicht ganz identisch gefunden, was auf die Anwesenheit von Erepsin und Begleitstoffen in verschiedenen Mengen zurückgeführt wird. Wir führen eine Kurve (Fig. 86) über zwei Gelatineversuche mit verschiedenen Enzympräparaten und eine Figur 87 über die Peptonspaltung an.

In dem „Hefentrypsin" (dem Hefenpepsin nach Dernby) sehen Willstätter und Grassmann eine Protease vom „Papaintypus". Die eigentümliche Wirkung dieser Proteasen kann durch die Hypothese erklärt werden, dass sie die undissoziierten Eiweissmoleküle angreifen. Das Magenpepsin und das echte Pankreastrypsin sollen dagegen die Eiweissionen, positive bzw. negative binden und spalten.

Die Hefenprotease wirkt auch auf Fibrin ein, nicht auf Eieralbumin. Die Versuche von Dernby über die Albuminspaltung wurden mit einem durch Säure stark veränderten, sog. Acidalbumin angestellt.

Herstellung der Enzymlösung.

Nach einer von Koelker[1] angegebenen Methode, der sich auch Dernby bedient hat, bereitet man eine Enzymlösung folgendermassen:

500 g gewaschene Brauereihefe werden mit 30 g Calciumcarbonat und 30 ccm Chloroform zerrieben und während drei Tagen sich selbst überlassen. Der

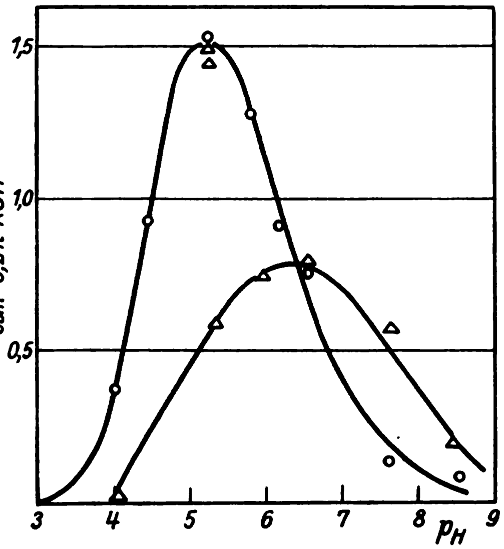


Fig. 86.

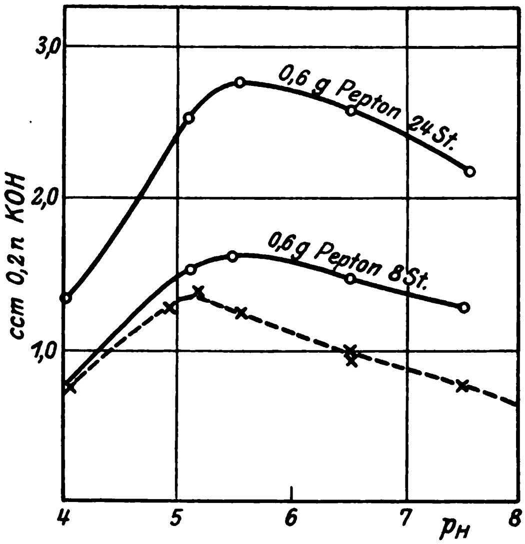


Fig. 87.

Autolysesaft wird danach durch wiederholtes Filtrieren klar gewonnen. Bei Stehen bei Zimmertemperatur verliert der Saft rasch an Wirksamkeit. Durch Dialyse durch Kollodium nach Sörensen können grosse Mengen von niedrigmolekularen Verunreinigungen beseitigt werden.

Nach Euler und Dernby[2] kann die proteolytische Wirksamkeit durch Vorbehandlung der Hefe mit Lindners Nährlösung vergrössert werden.

Dernby hat einige Methoden zur weiteren Reinigung des Enzymgemisches versucht. Die Aktivitätsverluste waren indessen zu gross.

Eine schnelle Vergiftung der unverdünnten Hefe durch Essigester oder Toluol und eine sehr kurz dauernde Autolyse unter Neutralisieren halten auch Willstätter und Grassmann für das beste Verfahren zur Gewinnung der Hefenproteasen. Die Verflüssigung nimmt in Anwesenheit von Essigester nur etwa 10 Minuten in Anspruch. Nach etwa einer Stunde und häufigem Neutralisieren mit Ammoniak wird die erste Fraktion des Autolysats, die

[1] Koelker, H. 67, 297; 1910.
[2] Euler und Dernby, H. 89, 408; 1914.

nur wenig Protease enthält, entfernt. Nach 1—2 Tagen ist die Protease genügend freigelegt.

Trennung von Hefentrypsin und Erepsin. Die Enzyme werden von Tonerde verschieden adsorbiert, und die Trennung kann durch fraktionierte Sorption durchgeführt werden. Durch eine erste Behandlung eines Essigesterneutralautolysates mit Tonerde wurde etwa die Hälfte des Erepsins und etwa 85% der Hefentryptase sorbiert. Durch eine zweite Tonerdesorption konnte alles Trypsin entfernt werden. In der Restlösung fanden sich noch 29% des Erepsins ohne tryptische Wirkung. Aus dem zweiten Sorbat konnte erepsinfreies Trypsin mit verdünntem Ammoniak eluiert werden. Ausbeute 35%.

Trennung der Proteasen von Saccharase. In einem Falle gelang es schon Hahn und Geret, ein saccharasefreies Proteasenpräparat zu gewinnen. Die Methode bestand in Alkohol- und Bleiacetatfällung. Willstätter und Grassmann fanden, dass man leicht aus den Autolysaten mit Essigsäure zugleich mit dem ausfallenden Hefeneiweiss viel Protease fällen kann, ohne dass nennenswerte Mengen Saccharase ausgeschieden werden. Die kleinen Mengen Saccharase, die dem Niederschlag anhaften, können durch Waschen mit sehr verdünnter Essigsäure entfernt werden. Mit verdünntem Ammoniak gehen dann die Proteasen in Lösung. Eine bedeutende Steigerung des Reinheitsgrades erreicht man durch Fällen der gealterten Autolysate mit Essigsäure.

Hemmungen der Hefenproteasen usw.

Die gewöhnlichen Antiseptica hemmen nicht[1]; auch 1% HCN soll nicht hemmen. Grössere Mengen Formaldehyd hemmen (0,5%). Kleinere Mengen Äthylalkohol und Glycerin sind ohne Einfluss (Dernby).

NaF ist ohne Einfluss[2]. Über die Wirkung von $CuSO_4$ auf die Hefenautolyse findet man Versuche bei Svanberg und Euler[3], welche eine recht starke Hemmung beobachteten. Die Autolyse kam in den mit Kupfersulfat versetzten Proben bald zum völligen Stillstand, was auf einer Zerstörung der Proteasen beruht. Hier wie bei mehreren anderen Enzymen dürfte die sog. Metallvergiftung aus zwei Faktoren zusammengesetzt sein, nämlich aus einer reversiblen Inaktivierung durch Salz- oder Komplexbildung und einer irreversiblen Zerstörung des Enzyms, welche damit zusammenhängt, dass die Enzymgiftverbindungen gewöhnlich eine kleinere Stabilität besitzen als das freie Enzym.

Der Hefenpresssaft enthält einen hemmenden Stoff, der von Buchner[4] Antiprotease genannt wurde. Dass dieser Stoff eine spezifische Wirkung hat,

[1] Gromow und Grigorjew, H. 42, 299; 1904.
[2] Euler und Dernby, H. 89, 408; 1914.
[3] Svanberg und Euler, Fermentf. 4, 90; 1921.
[4] Buchner und Haehn, Biochem. Zs 26, 171; 1910.

ist unwahrscheinlich. Seine Wirkung dürfte von derselben Art sein wie die Hemmung des Pankreastrypsins durch Serumalbumin u. dgl. Angaben von Haehn[1] über Beziehungen zwischen der Antiprotease und sog. Gärungsaktivatoren müssen schon aus dem Grunde mit Vorsicht aufgenommen werden, weil die Wirkung und sogar die Existenz dieser Stoffe sehr zweifelhaft ist.

Proteasen der Bakterien.

Alle untersuchten Bakterien enthalten Proteasen; über die Anzahl der Enzyme ist man nicht einig. Es scheint auch aus modernen Untersuchungen hervorzugehen, dass die Bakterienproteasen sozusagen weniger differenziert sind als die der höheren Tiere. So fand Dernby[2], wie man früher in alten Untersuchungen angenommen hatte, nur eine Protease, die von Trypsintypus sein soll; sie hat das pH-Optimum bei 6—7. Dies kann möglicherweise darauf hindeuten, dass wir hier tatsächlich mit anderen Proteasen zu tun haben, als in z. B. den tierischen Geweben. Andererseits ist das pH-Optimum weniger scharf abgegrenzt, was vielleicht damit zusammenhängt, dass in Wirklichkeit mehrere Enzyme mitwirken. Das Wahrscheinlichste ist wohl, dass auch hier Enzyme vom Papaintypus vorliegen.

Die oft geäusserten Ansichten, dass in vielen Bakterien keine Peptidasen vorkommen, dürften wohl auf unvollkommener Methodik beruhen. In modernen Untersuchungen fand man bei passender Acidität immer Peptidasewirkung. In saurer Lösung kann dagegen die z. B. von einer Pepsinase bewirkte Spaltung früh stehen bleiben, da die Wirkung der etwaigen Peptidase stark geschwächt ist.

Über die Frage, inwieweit die Proteasen der Bakterien in die Kulturlösung übergehen können, gibt es eine grosse Literatur. Darüber dürfte man einig sein können, dass eine wahre Sekretion von proteolytischen Enzymen nicht vorkommt. Sicher ist es indessen, dass in steril filtrierter Kulturflüssigkeit gewisser Bakterien-Proteasen auftreten. Es ist jedoch kein Grund zu einer anderen Annahme, als dass sie aus abgestorbenen oder geschädigten Zellen stammen. Durch besondere Reize können von der Oberfläche der Zellen Proteasen abgegeben werden. Es stimmt dies damit überein, dass durch Zusatz von gewissen Stoffen, wie Chloroform u. a. die Abgabe stark vergrössert werden kann.

Die moderne Methode zur Gewinnung des Enzymgemisches ist die Autolyse unter Zusatz von zelltötenden Mitteln. Eine Reinigung der Bakterienproteasen ist kaum versucht. Blanc und Pozerski haben durch Alkoholfällung eine gewisse Anreicherung erzielt[3].

Bezüglich des Gehaltes der verschiedenen Bakterien an Proteasen liegen

[1] Haehn und Schifferdecker, Biochem. Zs 138, 210; 1923.
[2] Dernby, Biochem. Zs 126, 105; 1922.
[3] Blanc und Pozerski, Soc. Biol. 83, 1315, 1343, 1369; 1920.

einige Versuche von Dernby und Walbum[1] vor. Wir führen folgende Tabelle an:

Bakterienart	Wirkungsgrad			
	Bouillonfiltrat		Zermahlene Bacillen	
	Gelatine	Pepton	Gelatine	Pepton
Tuberkelbacillen	0	0	0	0
Pneumokokken	0	0?	0?	10
Diphteriebacillen	0	2	0?	10
Staphylokokken	0	5	0?	20
Tetanusbacillen	0?	20	10	30
B. proteus, B. prodigiosus, B. pyocyaneus, B. histolyticus, B. sporogenes	100	100	50	50

Die Verfasser heben hervor, dass diese Schätzung recht subjektiv sein muss, und dass es wohl möglich ist dass die proteolytische Fähigkeit eines gewissen Bacillus unter verschiedenen Bedingungen stark variieren kann.

Über die optimale Acidität der Bakterienproteasen liegen ausser den eingangs erwähnten nur wenige Angaben vor. Dernby fand bei der Autolyse ein saures Optimum pH = 4—6. Blanc und Pozerski fanden bei pH = 5,5 in B. sporogenes und histolyticus Spaltung von koagulierten Proteinen.

Über die angreifbaren Substrate besitzen wir einige Angaben. Casein, Gelatine und das eigene Zelleiweiss werden angegriffen, nicht dagegen rohes Eiereiweiss u. dgl. Über Spezifität der Enzyme machen Avery und Cullen Angaben[2] dahingehend, dass die betr. Enzyme nur eigenes Zelleiweiss lösen.

Die Proteasen des Bacillus Natto hat neuerdings Oshima[3] studiert. Er fand, dass alle untersuchten Eiweisse ausser ungekochtem Eiereiweiss schnell und weitgehend gespalten wurden.

Eiweiss	Optimum pH
Casein, Verflüssigung bei 40°	5,9
„ Aminosäurebildung	7,8—8,4
Edestin, Verflüssigung	6,0
„ Aminosäurebildung	8,0—8,8
Wittepepton, Aminosäurebildung	9,1

Hieraus dürfte man mit dem Verfasser auf die Anwesenheit von peptonisierenden und peptonspaltenden Enzymen schliessen können.

[1] Dernby und Walbum, Biochem. Zs 138, 505; 1923.
[2] Avery und Cullen, Jl of exp. Med. 38, 199; 1923.
[3] Oshima, Jl of Soc. Agrik. Forestry. Sapporo, Japan, XVI, 387; 1925.

Dernby und Walbum[1] haben den Zusammenhang zwischen Proteasenwirkung und Toxicität gewisser Bacillen untersucht. Sie machen die Annahme, dass das Diphtherietoxin nichts anderes ist als ein Eiweissabbauprodukt. Sie fanden nämlich, dass die Toxicität ein Maximum erreicht und danach abfällt. Diese Zerstörung des Toxins, die lange bekannt ist, führen sie auf die weitere proteolytische Spaltung zurück. Es zeigte sich nämlich, dass die Acidität allein für die Toxinzerstörung nicht ausschlaggebend sein kann.

Phänomen von d'Herelle.

Ganz besonderes Interesse verdienen die verschiedenen Formen der Zellauflösung in tierischen Flüssigkeiten (Bakteriolyse), welche im wesentlichen wenigstens, auf proteolytischen Spaltungen beruhen. Unter diesen Formen der Zellauflösung hat ganz besonders das von d'Herelle entdeckte und nach ihm benannte Phänomen[2] wegen seiner medizinischen Bedeutung und der Eigenart der damit verknüpften Vorgänge zu eingehenden Studien angeregt.

Die ausserordentlich umfangreiche Literatur über das d'Herellesche Phänomen liegt zum grossen Teil ausserhalb des Rahmens dessen, was wir in diesem Band der „Chemie der Enzyme" zu behandeln haben. Denn, wenn auch die Wirkung der Bakteriophagen derjenigen proteolytischer Enzyme in vieler Hinsicht nahezustehen scheint, so weisen andererseits Bakteriophagen und Enzyme ganz bedeutende Unterschiede auf; die Analogien, welche gelegentlich hervorgehoben wurden, sind überwiegend formeller Art und lassen wesentliche Tatsachen unberücksichtigt. So ist z. B. die Vermehrung des Katalysators auf Kosten des Substrates (entsprechend der Vermehrung der Lysine auf Kosten der Bakterien) in der Enzymchemie vollkommen unbekannt. Man wird also d'Herelle darin beipflichten, dass die Bakteriophagen autonome Wesen (lebendes „Ultravirus") sind[3].

Immerhin erbietet das d'Herellesche Phänomen so viel von grösstem Interesse für die Enzymchemie und berührt so nahe manche ihrer Grundprobleme, dass wir im III. Teil dieses Werkes eingehender auf die anscheinend eigenartige Gruppe der zwischen den Bakterien und Enzymen stehenden „Ultramikroben" zurückkommen müssen.

---

[1] Dernby und Walbum, Biochem. Zs 138, 505; 1923. — Siehe auch Dernby und Siwe, Biochem. Zs 134, 3; 1922.

[2] d'Herelle, Le bacteriophage, Monogr. de l'Institut Pasteur. Paris 1921. — d'Herelle, C. r. 165, 373; 1917. — Nederl. Maanadschr. f. Geneesk. 13, 83; 1925. — Soc. Biol. 93, 498; 1925.

[3] Für die Beurteilung der Art der wirksamen Substanz ist ihr Verhalten bei und nach der Alkoholfällung nicht unwesentlich und ist von verschiedenen Seiten (d'Herelle 1921. — Bronfenbrenner, Proc. Soc. exp. Biol. a Med.) studiert und zu Schlüssen verwendet worden. d'Herelle vertritt die Auffassung, dass die Ultramikroben durch den Alkohol zerstört werden, und dass die schwach lytische Wirkung des Alkoholniederschlages auf ein proteolytisches Enzym zurückzuführen sei. Siehe auch Zbl. f. Bakt. (I) 96, 385; 1925.

Anhang zum Abschnitt über Proteasen.

Methoden zur Bestimmung der Eiweissspaltung.

Die Methoden zur Bestimmung der enzymatischen Eiweissspaltung gründen sich entweder auf die Bestimmung des zu jeder Zeit noch unveränderten Substrates oder die Bestimmung der nach einer gewissen Zeit gebildeten Reaktionsprodukte. Auch beim Studium einer so komplizierten Reaktion wie die des Eiweissabbaues genügt es für die Bestimmung der enzymatischen Tätigkeit eines Präparates, eine Methode zu besitzen, die die Berechnung der Enzymmenge in einer willkürlichen Einheit erlaubt. Wollen wir dagegen die verschiedenen Stufen der Reaktion kennen lernen und die dabei auftretenden Produkte, so wird es notwendig werden mehrere Methoden zur Bestimmung der anwesenden Stoffe gleichzeitig anzuwenden[1]. Die Bestimmung des unveränderten Substrates und die Bestimmung der Totalmenge der Spaltprodukte (z. B. die Menge freigemachten Aminostickstoffs) sind nach den befindlichen Methoden gut ausführbar, und nach einigen davon kann auch die Verteilung des Stickstoffs auf verschiedene Spaltprodukte einigermassen bestimmt werden. Da indessen die primären Spaltprodukte in den meisten Fällen noch nicht bekannt sind, ist es klar, dass noch mehrere Untersuchungsmethoden für ein volles Verständnis der Eiweissspaltung nötig sind.

Bestimmung des unveränderten Substrates.

a) Feste Substrate.

Obgleich man bei der Spaltung von festen Substraten die schon an sich sehr komplizierten Verhältnisse der Proteolyse noch unübersichtlicher macht, können diese Bestimmungsmethoden recht gute Dienste leisten, wenn es nur gilt, die relative Wirksamkeit eines Enzympräparates zu ermitteln. Manche von diesen Methoden besitzen ausserdem erhebliches historisches Interesse.

Die Mettsche Probe.

In engen Glasröhren wird Eiereiweiss aufgesogen und durch Einlegen in kochendes Wasser zur Koagulation gebracht. Zur Messung der Wirksamkeit einer Proteasenlösung wird

[1] Siehe z. B. die Charakterisierung der Pepsinwirkung durch Steudel, Ellinghaus und Gottschalk, H. 154, 21; 1926.

einfach ein Eiweissrohr hineingelegt und nach einer bestimmten Zeit die Länge der gelösten Eiweisssäule gemessen. Nach späteren Untersuchungen sollen sich die Enzymmengen wie die Quadrate der Längen der Säulen verhalten. Die Mettsche Probe wird am meisten bei Pepsinbestimmung angewandt. Eine passende Acidität muss natürlich durch Salzsäurezusatz eingestellt werden. Es ist klar, dass diese Methode nur eine sehr rohe Schätzung der Enzymmenge erlaubt.

Fibrinmethoden.

Sehr oft angewandt wurden die Methoden, nach welchen die Auflösung fester Fibrinflocken beobachtet wird[1]. Am besten färbt man dann das Fibrin nach Grützner[2] mit einem Farbstoff, der erst nach der Verdauung des Fibrins in die Lösung übergeht. Am häufigsten wurde Carmin verwendet. Das Fibrin wird gut ausgewaschen und in Glycerin aufbewahrt. Die Färbung geschieht in einer ammoniakalischen Farbstofflösung. Vor der Anwendung wird das Glycerin weggewaschen. Smorodinzew und Adowa[3] nehmen statt Carmin eine Glycerinlösung von Diphenylrosanilin. In der Versuchslösung kann colorimetrisch die Verdauung verfolgt werden. Eine Schwierigkeit bei dieser Methode ist, die Fibrinmengen in den verschiedenen Versuchen gleichmässig zu erhalten; die Verteilung des Fibrins kann nur schwer mit befriedigender Genauigkeit beurteilt werden. In neuerer Zeit hat Willstätter[4] eine neue Methode der Fibrinauflösung angewandt: Käufliches, trockenes Fibrin (Merck) wurde in der Kugelmühle fein gemahlen und durch ein Sieb mit 0,2 mm Maschenweite gesiebt. Vor dem Versuch wird die abgewogene Fibrinmenge in Wasser und einem Teil der Pufferlösung aufgeschwemmt. Zu der Suspension, die gewöhnlich 0,540 g lufttrockenes = 0,500 g trockenes Fibrin enthält, wurde die Enzymlösung, der Rest der Pufferlösung und Wasser gesetzt, so dass das Totalvolumen 15 ccm betrug. Das Gemisch wird während des Versuches im Schüttelthermostaten kräftig geschüttelt. Am Ende der Versuchszeit wird rasch auf 0° abgekühlt und zentrifugiert. Der ungelöste Teil wurde mit Eiswasser, Alkohol und Äther gewaschen und im Wägeglas bei 110 getrocknet und dann gewogen. In einem bei verschiedenen Enzymen verschieden weiten Bereich ist die Fibrinauflösung der Enzymmenge proportional.

In einer nach Abschluß des Kap. 21 erschienenen Untersuchung über Papain wenden Ringer und B. W. Grutterink[5] die Lösungsgeschwindigkeit von Spritblaufibrin als Mass der enzymatischen Wirksamkeit an. Wir führen aus ihrer Arbeit, deren Ergebnisse übrigens mit denen von Willstätter und Grassmann schwer vereinbar sind, eine Versuchsreihe (VIII, l. c. S. 290—291) an.

[1] Brücke, Sitz.-Ber. d. Kais. Akad. d. Wissensch. zu Wien 37, 131; 1859; 43, 601; 1861; v. Gorup-Besanez: Chem. Ber. 7, 1478; 1874; 8, 1510; 1875.
[2] Grützner, Pflüg. Arch. 8, 452; 1874; 106, 463; 1905.
[3] Smorodinzew und Adowa, H. 149, 173; 1925.
[4] Willstätter, Grassmann und Ambros, H. 152, 168; 1926.
[5] Ringer und B. W. Grutterink, H. 156, 275 u. zw. 290; 1926.

Papain de Bussy. Jedes Röhrchen 100 mg Spritblaufibrin, Salzsäure und Wasser bis zu 12 ccm oder Glykokolllösung und Wasser bis zu 12 ccm. Nach 30 Minuten 1 ccm Papainlösung mit 20 mg zugegeben. Verdauungszeit 6,5—12 Minuten.

Nr.	Norm. der Salzsäure	Verdauungszeit Min.	Inaktives Enzym		Aktives Enzym	
			pH	Verdauung korr. auf 12 Min.	pH	Verdauung korr. auf 12 Min.
1	0,052	12	1,47	2,435	—	2,798
2	0,015	6,5	2,41	4,812	—	280,112
3	0,008	8	3,06	3,500	—	135,900
4	0,004	12	3,70	2,485	—	24,600
5	0,0026	12	4,47	1,522	—	28,860
6	0,001	12	5,62	1,000	—	9,620
7	Glykokoll, 0,077 norm.	12	7,09	0,000	—	0,000

In der Figur 88 geben Ringer und Grutterink die Säurewirkung und die um die Säurewirkung korrigierte Enzymwirkung. „Wir sehen erstens

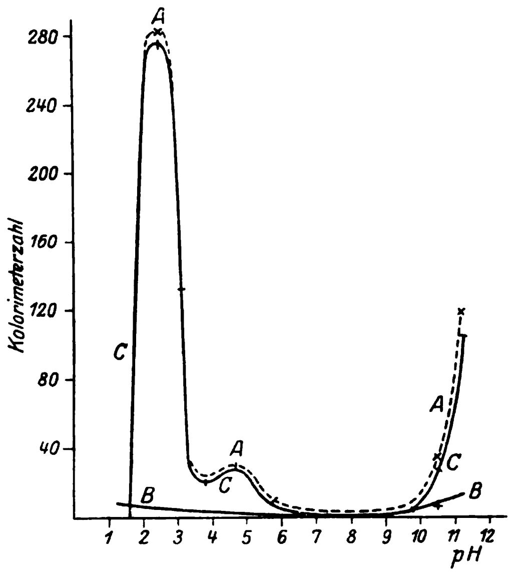


Fig. 88.
Lösungsgeschwindigkeit bei wechselnden Reaktionen von Spritblaufibrin durch Papain de Bussy. A Beobachtete Kurve. B Blindkurve. C Um die Blindwerte korrigierte Verdauungskurve.

wieder das sehr stark ausgeprägte Maximum der Fibrinlösung bei pH = etwa 2,5. In der Nähe von pH = 7 ist die Verdauung = 0 . . .“.

Elastinmethode von Abderhalden[1].

Aus dem Ligamentum nuchae des Pferdes bereitet Abderhalden durch Digerieren mit 1% KOH, danach mit 1% Essigsäure und schliesslich mit 5% HCl, Waschen mit Wasser

[1] Abderhalden und Strauch, H. 71, 320; 1911; Abderhalden und Wachsmuth H. 71, 339; 1911.

und Extraktion mit Alkoholäther sein Elastin. Die Auflösung des festen Substrates wird dann beobachtet. Für eine Schätzung der Enzymmenge kann die Methode in Frage kommen.

Caseinmethode von Volhard und Löhlein[1].

Diese Methode stützt sich einerseits auf ein von Thomas und Weber, andererseits ein von Meunier (1901) angegebenes Verfahren. Beide gehen vom Casein aus — Thomas und Weber lösen in 1900 ccm Wasser mit Hilfe von 3,2 g Ätznatron = 70 ccm $^1/_1$-n-NaOH, oder 5,04 g Salzsäure (= 138 ccm $^1/_1$-n-HCl) 100 g Casein auf. Die alkalische Lösung dient zur Bestimmung von Trypsin, die saure für Pepsin. Nach beendeter Verdauung wird eventuell mit Schwefelsäure angesäuert und mit 20% Glaubersalzlösung ausgesalzen. Nach dem Filtrieren wird der Niederschlag von Schwefelsäure durch Auswaschen befreit, dann wird das Filter nebst unverdautem Casein getrocknet und gewogen und das Gewicht des unverdauten Eiweisses mit dem bei einem gleichen blinden Versuche ohne Trypsin oder Pepsin erhaltenen verglichen. Die Menge des in Lösung gegangenen Eiweisses gibt das Mass für die verdauende Kraft des zu bestimmenden Magensaftes.

Nach Meunier wird der zu untersuchende Magensaft (14 ccm) mit Salzsäure (0,4 ccm pur.) und 1 g Casein versetzt und geschüttelt; nachdem sich das Casein abgesetzt hat, entnimmt man der klaren Flüssigkeit 2 ccm und bestimmt darin den Gehalt an freier Salzsäure. Die übrigen 10 ccm mit dem ungelösten Casein bleiben 24 Stunden im Wasserbade von 40°. Dann wird wiederum in 2 ccm Filtrat die Salzsäure bestimmt. Da durch Pepsinverdauung Salzsäure an Eiweiss gebunden wird, drückt die Abnahme des Wertes für freie Säure den Grad der Pepsinwirkung aus.

Volhard geht nun von der oben erwähnten gewichtsanalytischen Methode von Thomas und Weber aus. Diese basiert darauf, dass reines, unverändertes Casein in Verdauungssalzsäure gelöst, durch Natriumsulfat vollständig gefällt wird. Setzt man also unter sonst gleichen Bedingungen einer bestimmten, gleichen Menge Caseinlösung verschiedene Enzymmengen zu und lässt sie gleich lange im Wasserbad von 40° auf die Eiweisslösung einwirken, so wird der durch Zusatz von Natriumsulfat ausgefällte Rückstand um so geringer sein, je weniger Casein unverdaut geblieben, d. h. je mehr durch die Enzymwirkung peptonisiert worden ist: Je grösser der Rückstand, desto geringer die Enzymmenge unter den sonst gleichen Versuchsbedingungen. Auf Grund dieser Erwägung sammeln Thomas und Weber den Niederschlag auf gewogenem Faltenfilter, waschen ihn mit destilliertem Wasser aus, trocknen und wägen ihn. Die Gewichtsdifferenz der Rückstände aus einem pepsinhaltigen und einem pepsinfreien Versuch dient also hier als Mass für die peptische Wirkung.

Die Umständlichkeit dieser Gewichtsbestimmung vermeidet Volhard durch Titration der Filtrate. Er geht von der Annahme aus, dass bei fortschreitender Peptonisierung der Caseinlösung die Acidität des Filtrates zunehmen müsse, indem die durch das Natriumsulfat nicht mehr fällbaren salzsauren Peptone das Filter passieren.

Ricinmethode von M. Jacoby[2].

1 g Ricin Merck wird in 100 ccm 1,5%iger Kochsalzlösung aufgeschwämmt. Zu jeder Probe nimmt man 2 ccm dieser Ricinlösung und setzt dazu für die Pepsinbestimmung 0,5 ccm 0,1 n HCl. In einer Anzahl Röhren, die so beschickt worden sind, gibt man nun absteigende Mengen der zu untersuchenden Pepsinlösung und füllt mit gekochter Enzymlösung auf 3,5 ccm auf. Die Röhren werden dann 3 Stunden im Brutschrank gehalten, und man sieht nach, bei welcher Verdünnung eben die anfangs sehr trübe Ricinlösung klar geworden ist.

---

[1] Volhard und Löhlein, Münch. med. Wochenschr. 1903, Nr. 49 und Hofm. Beitr. 7, 1906.

[2] Jacoby, Biochem. Zs 1, 53; 1906. — Jacoby und Solms, Zs f. klin. Med. 64; 1907.

Methode von Michaelis und Rothstein[1].

Zur Pepsinbestimmung nimmt man mit Wasser 12fach verdünntes Serum (Mensch oder Versuchstier) und setzt so lange eine 10% Lösung von Sulfosalicylsäure zu, bis Kongopapier eben violett gefärbt wird. Dies entspricht etwa pH = 1,9. Zu 5 ccm dieser stark trüben Eiweisslösung setzt man 1 ccm verschieden stark verdünnter Enzymlösung. Die Zeit zur Aufhellung der Lösung wird mit derselben Zeit in einem Versuche mit einer Kontrollenzymlösung verglichen. Als Kontrollenzymlösung wird eine unbegrenzt haltbare glycerinhaltige Lösung eines käuflichen Pepsinpräparates benutzt.

b) Gelöste Substrate.

Ausfällung des unveränderten Substrates.

Hier kann jedes Substrat benutzt werden, das von einem geeigneten Fällungsmittel gefällt wird, ohne dass die durch die Enzymwirkung entstandenen Produkte gefällt werden.

Methode von Sörensen[2]. Sörensen benutzte zu seinen Versuchen über die Pepsinverdauung eine Lösung von Acidalbumin. Die nach verschiedenen Zeiten noch vorhandenen Mengen Substrat werden durch Fällung mit Gerbsäure oder Stannochlorid entfernt und im Filtrat der Stickstoff bestimmt (Kjeldahl). Die Gerbsäurelösung enthält nach Hedin am besten[3]: 100 g Gerbsäure, 50 g NaCl, 50 g Natriumacetat und 50 ccm Eisessig im Liter. Die Stannochloridlösung Sörensens wird durch Lösen von 50 g Zinn in rauchender Salzsäure, Eindampfen zu 130 ccm und Verdünnen auf 1 Liter hergestellt.

Methode nach Glässner[4]. Hier wird Globin aus Rinderblut als Substrat verwendet. Aus salzsaurer Lösung wird das unveränderte Globin mit Ammoniak gefällt (Pepsinbestimmung).

Methode von Gross[5]. Eine saure Caseinlösung wird durch Zusatz von Natriumacetat gefällt. Als Pepsineinheit gilt die Pepsinmenge, die in 15 Min. 10 ccm einer 1‰igen Caseinlösung so verändert, dass nunmehr keine Fällung mit NaAc erhalten wird.

Methode von Fuld-Ege. 0,1 g Edestin Merck wird in 100 ccm 0,03 n HCl unter Kochen gelöst. Nach einer Verdauungszeit von 30 Min. setzt man festes Kochsalz zu und beobachtet, ob eine Trübung auftritt[6]. Ege[7] hat diese Methode dahin modifiziert, dass er nach einer gewissen Ver-

[1] Michaelis und Rothstein, Biochem. Zs 105, 60; 1920. — Dtsch. med. Woch. 1918, Nr. 25.
[2] Sörensen, Biochem. Zs 21, 288; 1909.
[3] Hedin und Masay, H. 100, 263; 1917.
[4] K. Glässner, Biochem. Zs 127, 312; 1922.
[5] Gross, Berl. klin. Woch. 1908, Nr. 13; 643.
[6] Fuld und Levison, Biochem. Zs 6, 473; 1907.
[7] Ege, H. 127, 125; 1923.

dauungszeit die Menge Salzlösung bestimmt, die zur Erreichung eines bestimmten Trübungsgrades nötig ist.

Nephelometrische Methode von Rona und Kleinmann[1]. Als Substrat wird verdünntes, menschliches Blutserum verwendet. Die Trübung von nach verschiedenen Zeiten entnommenen Proben durch Sulfosalicylsäure und Salzsäure wird nephelometrisch mit der Trübung der ursprünglichen Eiweisslösung durch dasselbe Reagens verglichen. 20 ccm Serumverdünnung $^1/_{25}$ wird mit Aciditätsregulator und physiologischer Kochsalzlösung auf 75 ccm verdünnt. Zwei Proben von je 5 ccm werden ausgenommen und durch Zusatz von 5 ccm Flüssigkeit neutralisiert. Dann wird durch Zusatz von 5 ccm 25% HCl und 8 ccm 20% Sulfosalizylsäurelösung die Trübung hergestellt und nach 3 Min. im Nephelometer untersucht. In ähnlicher Weise verfährt man mit den nach Zusatz der Enzymlösung zu den übrigen 65 ccm Eiweisslösung gewonnenen, mehr oder weniger verdauten Proben. Die Trübung ist dem Eiweissgehalt genau proportional.

Gelatineverflüssigung nach Fermi, Modifikation von Th. Madsen, Palitzsch und Walbum[2]. 1400 g gute Gelatine werden unter Zusatz von 2 g Thymol auf 4000 ccm in lauwarmem Wasser gelöst. Von dieser 35%igen Lösung werden 200 g vor der Ausführung des Versuches auf 1 Liter verdünnt. In den Versuchen werden 40 ccm dieser Lösung zu 50 ccm verdünnt. Durch Zugabe von Säure bzw. Lauge wird die erwünschte Acidität eingestellt. Nach bestimmten Zeiten werden 5 ccm ausgenommen, durch 1 ccm Lösung von Base bzw. Säure neutralisiert, in ein Probierrohr gefüllt und ohne Schütteln während 15 Min. abgekühlt. Die Konsistenz der Gelatine wird dann nach einer besonderen Skala beurteilt. Diese Methode, der sich viele Autoren auch in den letzten Jahren bedient haben, ist, von anderen eventuellen Fehlern abgesehen, recht grob, da die Beurteilung der Konsistenz der Gelatine notwendigerweise recht willkürlich werden muss.

Chemische Bestimmung der Reaktionsprodukte.

Diese Methoden, die erst eine genaue Messung der enzymatischen Eiweisshydrolyse ermöglicht haben, gründen sich auf die Bestimmung einiger der durch die Enzymwirkung freigesetzten Atomgruppen. Die ausserordentlich anwendbaren Methoden der Bestimmung der Aminogruppen nach van Slyke und der Bestimmung des Carboxyls nach Sörensen und nach Willstätter und Waldschmidt-Leitz brauchen wir hier nicht zu beschreiben, da sie schon im Zusammenhang mit den Peptidasen beschrieben worden sind (vgl. S. 443 u. ff.). Das gleiche gilt von der Bestimmung des Aminostickstoffs nach Folin.

[1] Rona und Kleinmann, Biochem. Zs 140, 478; 1923.

[2] Fermi, Arch. f. Hyg. 12, 242; 1891; 55, 142; 1906. — Palitzsch und Walbum, Biochem. Zs 47, 1; 1912.

Unzweifelhaft verdienen, wie neuerdings auch Waldschmidt-Leitz hervorhebt, für die Messung der Pepsinwirkung einfache chemische Methoden, die nur selten angewandt worden sind, den Vorzug. „Allein die chemische Analyse, die die gesamte Menge gebildeter Reaktionsprodukte erfasst, gewährleistet eine sichere Beschreibung des enzymatischen Reaktionsverlaufs. Verfahren zur Bestimmung des Pepsins, die diese Richtlinien befolgen, werden auf der Ermittlung der bei der Hydrolyse freigelegten sauren oder basischen Gruppen aufzubauen sein, auf deren Bildung zuerst die Untersuchungen von V. Henriques und J. K. Gjaldbäk[1] und von J. Christiansen[2] hingewiesen haben. So erweist sich das Verfahren der alkalimetrischen Bestimmung von Aminosäuren und Peptiden in alkoholischer Lösung, das die

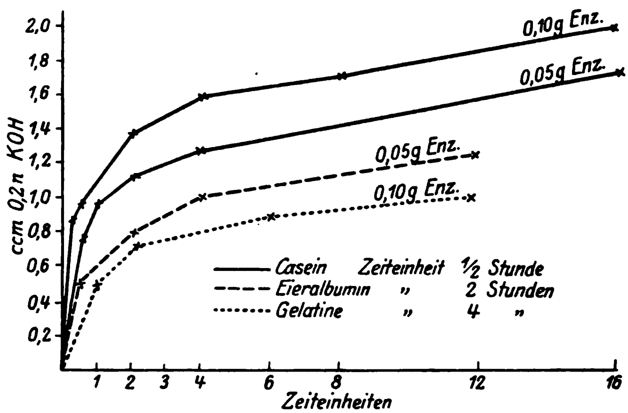


Fig. 89.
Pepsinwirkung und Acidität.

Gesamtheit der bei der Proteolyse entstehenden sauren Gruppen ergibt und das sich bei der Untersuchung vieler anderer Proteasen bewährt hat, auch für den Fall der peptischen Verdauung als geeignet."

„Die alkalimetrische Analyse der Verdauungsprodukte ergibt für die Wirkung des Pepsins auf die verschiedenen Substrate, wie Waldschmidt-Leitz in vorstehender Fig. 89 veranschaulicht, in allen Fällen beträchtliche Zunahmen an Acidität. Die allgemeinere Anwendbarkeit dieses Verfahrens für den Vergleich verschiedener Proteolysen geht zudem aus der Tatsache hervor, dass der Reaktionsverlauf der Enzymwirkung unabhängig von der Natur der angewandten Substrate beobachtet wird."

„Der von E. Schütz aufgestellten Beziehung, nach welcher der Umsatz $x = k\sqrt{t}$, folgt der Verlauf der Aciditätszunahmen indessen (Waldschmidt-Leitz, Tabelle 1, S. 122) in keinem Falle."

Hingewiesen sei hier nochmals auf die vergleichenden Versuche, welche

[1] Henriques und Gjaldbäk, H. 75, 362; 1911 und 83, 83; 1913.
[2] J. Christiansen, Biochem. Zs 46, 50; 1912.

Steudel, Ellinghaus und Gottschalk[1] über Pepsinwirkung an verschiedenen Substraten (Casein, Serumglobulin und Glutencasein) mit den Methoden von Sörensen und Willstätter, van Slyke und Folin angestellt haben.

M. Kawahara[2] titriert eine mit Kongorot versetzte 0,5 ‰-Lösung von Eieralbumin in 0,1 n. HCl und gibt die Grenzkonzentration des Pepsins an, die noch einen deutlichen Umschlag in Blauviolett hervorruft. Über die klinische Anwendbarkeit des Verfahrens haben wir keine Erfahrung; an Genauigkeit kommt es der Titration in alkoholischer Lösung nicht gleich.

Physikalisch-chemische Methoden.

Zu nennen sind schliesslich noch eine Methode zum Vergleich der enzymatischen Wirksamkeit von Enzymlösungen, wobei doch auf die absolute Bestimmung der Reaktionsprodukte verzichtet wird. Dies ist die Bestimmung der Leitfähigkeit. Sjöqvist[3] fand, dass während der Pepsinverdauung eine bedeutende Änderung der Leitfähigkeit eintritt, und hat zuerst die Leitfähigkeitsbestimmung für die Messung der Pepsinverdauung angewandt, nach ihm haben Bayliss u. a. sie benutzt. Northrop hat später diese Methode weiter ausgebildet[4].

Eine optische Methode hat E. Schütz[5] zur Anwendung gebracht. Er entfernt aus den pepsinhaltigen Albuminlösungen das unverdaute Eiweiss und bestimmt aus der optischen Drehung der zurückbleibenden Lösung die Menge der gebildeten Peptone. Ebenso haben E. Schütz und Huppert[6] gearbeitet. Wir stimmen mit Waldschmidt-Leitz und Simons (H. 156) darin überein, dass diese Methode der weiteren Grundlage entbehrt.

Noch weniger kann die Methode von Spriggs, den Fortschritt der Eiweissspaltung durch Messung der inneren Reibung von Eiweisslösungen zu ermitteln, empfohlen werden.

Die Ergebnisse dieser Methode werden, wie Waldschmidt-Leitz zutreffend bemerkt, durch die Eigenschaften unbekannter und ungleichartiger Zwischenprodukte in hohem Masse beeinflusst. „So ergibt der Vergleich der peptischen Hydrolyse beispielsweise von Casein und von Gelatine, der auf die viscometrische Analyse des Reaktionsverlaufes gegründet ist und den die nachstehende Figur 90 veranschaulicht, ein durchaus verschiedenes Verhalten. Während die innere Reibung der Gelatinelösung unter der Einwirkung des Pepsins eine rasche Abnahme erfährt, die nach kurzer Zeit zu einem Endwert führt, bewirkt im Beispiel des Caseins die Bildung eines hochviscosen Zwischen-

[1] Steudel, Ellinghaus und Gottschalk, H. 154, 21; 1926.

[2] M. Kawahara, Pflüg. Arch. 206, 360; 1924. — Kawahara und Peczenik, ebenda 206, 369; 1924.

[3] Sjöqvist, Skand. Arch. Physiol. 5, 277; 1893/95.

[4] Northrop, Jl of gen. Physiol. II, 113; 1919.

[5] E. Schütz, H. 9, 577; 1885.

[6] E. Schütz und Huppert, H. 30, 1; 1900.

produktes der Hydrolyse zunächst einen bedeutenden Anstieg der Viscosität, deren Abklingen erst mit dem langsam erfolgenden Abbau dieses Zwischenproduktes einsetzt. Die messbare Menge des gebildeten Reaktionsproduktes, die das Ausmass der beobachteten Viscositätserhöhung bestimmt, hängt, wie aus der Figur hervorgeht, von dem Geschwindigkeitsunterschied seiner Bildung und seiner Spaltung ab, der mit der angewandten Enzymmenge wechselt. So ist es zu erklären, dass die Wirkung geringer Enzymmengen

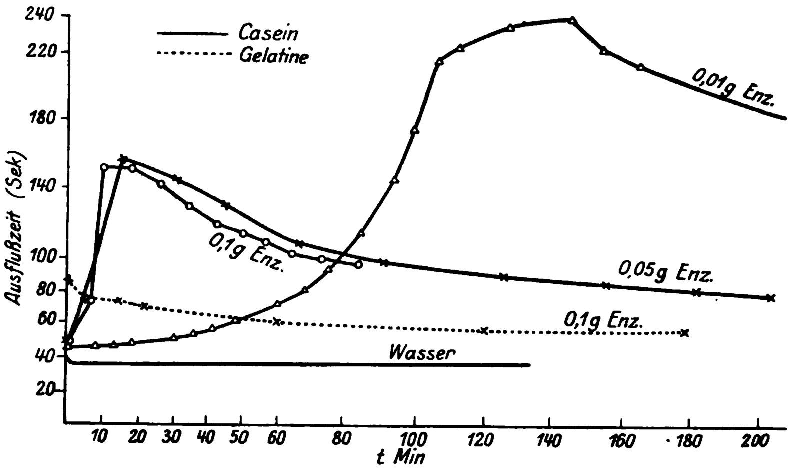


Fig. 90.
Pepsinwirkung und Viscosität.

zu absolut höheren Viscositätswerten führt, als sie bei Anwendung grosser Pepsinmengen beobachtet werden; eine einfache Messung des Enzyms lässt sich auf Grund der viscosimetrischen Analyse nicht durchführen."

„Zu den in der Figur veranschaulichten Versuchen verwandte man 20,0 ccm 3%ige Lösung von Casein bzw. 10,0 ccm 6%ige Gelatine mit je 10,0 ccm 1/5 mol. Salzsäure, Citratpuffer von pH = 1,2 und wechselnden Mengen Pepsin bei 30°, das pH des Versuchsansatzes betrug 2,8 bzw. 2,2; die Bestimmung der inneren Reibung erfolgte im Ostwaldschen Viscosimeter durch Messung der Ausflusszeit gleicher Volumina der Ansätze bei 30°.

24. Kapitel.

Lab, Chymosin.

A. Einleitung.

Dass Extrakte aus dem vierten Magen des Kalbs die Fähigkeit haben, Milchgerinnung hervorzurufen, ist längst bekannt und ausgenutzt[1]. Die alte Deutung des Vorgangs, die ihn in Verbindung mit der Milchsäurebildung setzten (Liebig), wurde durch Arbeiten von Berzelius u. a. als unrichtig erwiesen. Durch grundlegende Versuche konnte in späterer Zeit Hammarsten, dem wir die bedeutendsten Arbeiten in diesem schwierigen Kapitel verdanken, die völlige Unabhängigkeit der Labgerinnung von der Milchsäurebildung zeigen und den Vorgang als eine Enzymwirkung charakterisieren. Als Name des Enzyms schlug er Chymosin vor[2]. (Im Vorschlag Oppenheimers, den Namen in „Chymase" zu ändern, können wir keinen Fortschritt sehen.)

Die Frage über die Wirkungsweise des Chymosins ist eine sehr verwickelte. Dies beruht teilweise darauf, dass die gewöhnliche Bestimmungsmethode des Chymosins, die Messung der Gerinnungszeit einer Milchprobe, in keiner Weise durchsichtig ist. Abgesehen davon, dass der Ausfall der Prüfung von Verschiedenheiten in der Milch usw. abhängt, steht es gar nicht fest, dass die Ausfällung des Caseins mit der eigentlichen Enzymwirkung zusammenhängt. Vielmehr dürfte es ziemlich sicher sein, dass die Ausfällung ein sekundärer Vorgang ist, der nur darauf beruht, dass gewisse Produkte der Chymosineinwirkung mit anderen Stoffen der Milch schwer lösliche Verbindungen bilden.

Es kann nämlich als bewiesen angesehen werden, dass die Wirkung des Chymosins ein Abbau des Caseinogens[3] ist. Es hat sich gezeigt, dass die Umwandlung von Caseinogen in Casein mit einer Spaltung verbunden ist, und dass diese Spaltung durch Chymosin nicht, wenn die Caseinstufe erreicht ist, aufhört, sondern weiter geht[4]. Caseinogen wird also von Chymosin

[1] Über die Lokalisation des Labenzyms im getrockneten Labmagen siehe Hekma und Brouwer, Ref. in Ber. ges. Physiol. B. 36, 218; 1926.

[2] Ältere Literatur bei Bang, Erg. d. inn. Med. 9, 435; 1912.

[3] Mit Caseinogen bezeichnen wir das lösliche Proteid der Milch; mit Casein ein Abbauprodukt davon, das gerinnungsfähig ist. (Oppenheimer hat sich ebenfalls dieser Nomenklatur angeschlossen.)

[4] van Dam, H. 61, 147; 1909.

abgebaut. Abbau und Gerinnung gehen parallel. Das Eintreten der Gerinnung hat nur insofern etwas mit der Enzymwirkung zu tun, als eine gewisse Abbaustufe ausfallen kann, und zwar hat es sich gezeigt, dass die Koagulation an die Anwesenheit von Kalksalzen gebunden ist. Das was gefällt wird, ist eine komplexe Verbindung von Casein und Kalk.

Das Chymosin ist also sicher ein caseinogenspaltendes Enzym, es bleibt zu untersuchen, ob seine Wirkung auf Caseinogen beschränkt ist oder ob es auch andere Eiweissstoffe angreift, d. h. ob es eine Casease oder eine Protease ist. Nun weicht Casein als Salz einer substituierten Phosphorsäure in seiner Konstitution von den eigentlichen Proteinen stark ab und wird, wie bekannt, von den verschiedenen Proteasen sehr leicht angegriffen. Es wäre deshalb nicht auffallend, wenn das Chymosin nur Caseinogen angriffe. Wir wissen indessen aus Hammarstens Arbeiten, dass auch andere Proteine, allerdings solche von etwas eigenartiger Konstitution, das Legumin der Erbsen und das Syntonin, das Acidalbumin des Muskels, von Chymosin abgebaut werden[1]. Sehr interessant ist auch die Entdeckung Neubergs[2], dass künstlich phosphorylierte Proteine bei Gegenwart von Kalksalzen von Chymosin zur Gerinnung gebracht werden. Wir dürften also behaupten können, dass das Chymosin eine Protease ist. Es liegt, wenn dies richtig ist, eigentlich kein Anlass vor, das Chymosin von den anderen Proteasen getrennt zu behandeln; aber der charakteristische Vorgang, der die grösste Aufmerksamkeit erweckt hat, die Koagulation, und die eigenartigen Bestimmungsmethoden dieses Enzyms rechtfertigen, dass wir hier das Chymosin von den eigentlichen Proteasen getrennt behandeln. Übrigens ist über die wahre Natur und die Wirkungsweise des Enzyms so wenig bekannt, dass wir über die eigentlich proteolytischen Wirkungen desselben beinahe nichts sagen können.

Beruht nun die Gerinnung der Milch durch Lab darauf, dass eine Stufe im Caseinogenabbau durch Kalksalze fällbar ist, so konnte eine Gerinnung erwartet werden, wenn überhaupt eine Protease das Caseinogen spaltet. Dahin spricht sich z. B. Oppenheimer aus und führt auch an, dass alle Säfte usw., die Proteasen enthalten, auch eine Labwirkung zeigen. Es muss indessen hier die Aufmerksamkeit darauf gelenkt werden, dass nicht alle Proteasen, welche Caseinogen spalten, auf dieselbe Weise angreifen und dieselben Zwischenstufen erzeugen müssen. So ist es wohl wahrscheinlich und geht übrigens aus vielen Versuchen hervor, dass der Abbauweg der Eiweissstoffe bei Pepsin ein ganz anderer ist als bei Pankreastrypsin. Es ist, wie auch Oppenheimer hervorhebt, durchaus wahrscheinlich, dass das Chymosin der dritten Gruppe der Proteasen, nämlich denen vom „Papaintypus“ (Willstätter) angehört, deren besondere Wirkung sein soll, dass sie die Proteine bei deren isoelektrischen Punkten angreifen. Diese hypothetische

[1] O. Hammarsten, H. 102, 105; 1918.
[2] Neuberg und Oertel, Biochem. Zs 60, 491; 1914.

dritte Gruppe gewinnt durch neuere Untersuchungen immer mehr an Wahrscheinlichkeit. Dahin gehört nach den neuesten Untersuchungen Willstätters die Hefenprotease. Zählen wir einstweilen das Chymosin dieser Gruppe zu, so liegt der Gedanke nahe, dass das Chymosin mit der Gewebspepsinase identisch ist[1]. Dies gilt für das echte Kalbslab, nicht für die labenden Enzyme der älteren Tiere. Es hat sich nämlich gezeigt, dass diese, die sog. Parachymosine, sich von dem echten Kalbslab qualitativ unterscheiden, und zwar dürfte man annehmen können, dass die Labwirkung des Magensaftes der ausgewachsenen Tiere von dem echten Pepsin ausgeübt wird (siehe unten).

Wir begegnen hier der alten Streitfrage, ob die Labwirkung von dem Pepsin ausgeübt wird. Die Ansicht, dass Lab und Pepsin identisch sind, stammt von Pawlow[2]. Er beobachtete, was andere Autoren später bestätigt haben, dass in Fistelsäften von Hunden die Wirkungen vollkommen parallel gehen. Bei anderen Tieren ist es ebenso und die Parallelität bleibt auch nach teilweiser Zerstörung der Enzymlösung bestehen.

Andererseits liegen Versuche, besonders an Kälbern, vor, denen zufolge von einer solchen Parallelität keine Rede sein kann. Hammarsten[3] beobachtete, dass bei Kalbslab die labende Wirkung viel grösser war als die peptische, während bei Hundefistelsaft das Verhältnis umgekehrt ist. Wurden die Enzyme nicht auf Milch, sondern auf eine reine, schwach saure Caseinogenlösung geprüft, so zeigte sich dasselbe Verhältnis. Bei Vergleich von Lab und Schweinepepsin fand auch van Dam[4], dass Präparate, die gleich stark labend wirkten, eine verschieden starke Pepsinwirkung zeigten. So war in einem Falle bei der Mettschen Probe das Schweinepepsin 9mal wirksamer.

In weiteren Arbeiten kam Hammarsten dann durch Versuche in neutraler Lösung mit Alkalicaseinaten, wo die Wirkung des Pepsins verschwindend klein ist, zum Resultat, dass, nach der Mettschen Probe beurteilt, pepsinreiche und pepsinarme Präparate gleich stark caseinogenabbauend wirken können. In derselben Weise schloss er, dass der Chymosinabbau des Legumins mit dem Pepsin nichts zu tun hat. Dies gilt nun, wie wir auch früher betont haben, für das echte Chymosin ganz junger Tiere.

Der endgültige Beweis, dass das echte Lab und das Pepsin ganz verschiedene Enzyme sind, wäre die präparative Trennung oder die Zerstörung des einen Enzyms unter Erhaltung der Wirkung des anderen.

Hammarsten hat in einer Reihe ausgezeichneter Arbeiten zuerst gezeigt, dass man durch Erwärmen von Kalbslab die labende Kraft stark schwächen kann, ohne dass die geringe Pepsinwirkung beeinflusst wird. Diese

---

[1] Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen, 983.
[2] Pawlow und Parastschuk H. 42, 415; 1904.
[3] O. Hammarsten, H. 56, 18; 1908.
[4] van Dam, H. 79, 247; 1912.

Versuche sind von Schmidt-Nielsen[1] bestätigt worden. Andere Methoden haben Burge[2], Rakoczy[3] und andere gefunden. Die gegen diese Befunde erhobenen Einwände, dass die Entstehung von bei verschiedenen Aciditäten verschieden wirkenden Hemmungskörpern die Abschwächung des einen Enzyms vortäuschen könnte, sind nach neuen Versuchen von Hammarsten nicht stichhaltig.

Er verrieb die Drüsenschicht des Labmagens mit der fünffachen Menge Kochsalz und trocknete die Masse. Wenn er 40 g des Trockenpräparates mit 100 ccm Wasser behandelte, bekam er eine Lösung, die stärker peptisch wirkte, und einen ungelösten Rest, der kaum Pepsin enthielt aber stark labend wirkte. Hammarsten gibt folgende Zusammenstellung[4].

		Chymosinwirkung	Pepsinwirkung
Nr. 1	Lösung	1	> 100
	Bodensatz . . .	5	1
Nr. 2	Lösung	1	> 200
	Bodensatz . . .	7	1
Nr. 3	Lösung	1	> 800
	Bodensatz . . .	1,6	1
Nr. 4	Lösung	1	> 600
	Bodensatz . . .	1	1

Beim Vergleich mit einer nicht behandelten verdünnten Infusion erwies sich die Pepsinwirkung als relativ 50 mal grösser als die des Kochsalzbodensatzes, während umgekehrt in der Kochsalzpräparatlösung die Pepsinwirkung 200 mal grösser war als in der unbehandelten Infusion. Eine wirkliche Trennung der Enzyme ist also durchgeführt worden.

Nach einer anderen Methode, die hauptsächlichst in Fällung mit gesättigter Kochsalzlösung und Dialyse besteht, konnte Hammarsten auch ein vollkommen pepsinfreies Chymosin darstellen[5].

Die Versuche Hammarstens und auch anderer Forscher machen es wahrscheinlich, dass das echte Kalbslab ein selbständiges Enzym ist, das von Pepsin ganz unabhängig ist. Das Chymosin wäre demnach eine in schwach saurer Lösung wirksame, selbständige Protease. Unbedingt erforderlich ist noch eine Untersuchung mit genau eingehaltenen Aciditäts-

[1] Schmidt-Nielsen, H. 48, 92; 1906. Vidensk. Skrifter, I. Math. Naturv. Kl. 1908, 9 Christiania 1908.
[2] Burge, Amer. Jl Physiol. 29, 330; 1912.
[3] Rakoczy, H. 68, 421; 1910 und 73, 453; 1911.
[4] O. Hammarsten, H. 94, 104; 1915.
[5] O. Hammarsten, H. 108, 243; 1919 und 121, 240; 1922.

bedingungen, um zu zeigen, ob Chymosin wirklich derjenigen Gruppe von Proteasen angehört, die durch ein pH-Optimum bei etwa pH = 5 charakterisiert sind.

B. Darstellung einer Chymosinlösung aus Magenschleimhaut.

Aus der Schleimhaut des Magens, die als der einzige normale Bildungsort des Enzyms angesehen werden muss, gewinnt man durch Auslaugen mit sehr verdünnter Säure (0,1—0,2% HCl) eine Lösung, die nach Neutralisieren eine starke Labwirkung zeigt. Mit Ammonsulfat und mit Kochsalz kann das unreine Enzym ausgesalzt werden. Auch eine Fällung mit Alkohol ist möglich.

Die Behandlung der Schleimhaut mit Säure soll nach der älteren Auffassung die Überführung eines Zymogens in fertiges Enzym bewirken. Nach anderen Ansichten (Hedin) dagegen ist sie als eine Beseitigung natürlicher Hemmungskörper zu betrachten [1]. Überhaupt ist diese Frage noch unmöglich zu beantworten, da unsere Kenntnisse über die Chymosinwirkung im allgemeinen recht lückenhaft sind.

Reinigungsversuche im modernen Sinne sind nicht vorgenommen. Die chemischen Eigenschaften der Präparate sind also im wesentlichen die der Verunreinigungen. Besonders geben die Präparate oft die gewöhnlichen Eiweissreaktionen.

C. Wirkungsgrad und Bestimmung.

Wie wir oben auseinandergesetzt haben, ist die Wirkung des Kalblabs die einer Protease, welche vielleicht aus dem einen oder anderen Grunde Caseinogen leichter als andere Eiweissstoffe angreift. Der Labung geht sicher ein Abbau voran; nur ist es nicht festgestellt, wie tiefgreifend dieser ist. Einen Zuwachs des Formolstickstoffs hat man bisher nicht beobachten können. Aus diesem Grunde den Schluss zu ziehen, dass die Spaltung eine rein physikalische Desaggregation ist, kann nicht statthaft sein. Wir weisen darauf hin, dass ähnliche Annahmen für die anderen wahren Proteasen gemacht worden sind, dass aber alle modernen Untersuchungen zeigen, dass der proteolytische Eiweissabbau rein chemisch aufzufassen ist.

Die wirksame Menge des Labs bestimmt man gewöhnlich, indem man die Zeit misst, die zwischen dem Zusatz des Chymosins zu einer Milchprobe und der Gerinnung verfliesst. Wir wissen nämlich, dass die Reaktionsgeschwindigkeit den Enzymmengen direkt proportional ist, dass also in diesem Falle

$$\text{Gerinnungsdauer} \times \text{Chymosinkonzentration} = \text{Konst.}$$

Bei sehr verdünnten Enzymlösungen zeigen sich Abweichungen von diesem einfachen Gesetz, indem sie eine relativ längere Gerinnungszeit erfordern. Dies wird auf Enzymzerstörung zurückgeführt [2].

---

[1] Hedin, H. 72, 187; 1911 und 74, 242 und 76, 355; 1912.

[2] Gerber, Soc. Biol. 63, 575; 1907. — van Dam, H. 61, 147; 1909 und 64, 316; 1910.

Über eine Artspezifität des Chymosins in dem Sinne, dass es die Milch der eigenen Tierart besser labt, liegen Versuche vor. Nach einer Untersuchung von Bang[1] ist indessen eine diesbezügliche Spezifität recht zweifelhaft. Verschiedenheiten in der Wirkung beruhen eher auf Verschiedenheiten der Caseine. Übrigens ist die Bestimmungsmethode eine solche, dass sekundäre Einflüsse nicht leicht ausgeschlossen werden können. Die grösste Beachtung verdient nämlich der Umstand, dass das, was in der Mehrzahl der Untersuchungen gemessen wird, die Ausfällung des Caseins, ein sekundärer Vorgang ist, der mit der Enzymwirkung nichts zu tun hat, und der von allerlei Umständen beeinflusst werden kann, ohne dass eine Einwirkung auf das Enzym vorhanden ist.

Die Fällung des Caseins beruht auf der Anwesenheit von Kalksalzen in der Lösung. Der ausfallende Niederschlag ist eine komplexe Kalkverbindung und wurde früher Paracaseinkalk genannt[2]. Nach unserer Nomenklatur ist Caseinkalk der Name. Verreibt man Caseinogen mit reinem Calciumcarbonat und Wasser, so erhält man eine etwa neutrale Lösung von Caseinogenkalk. Durch Einwirkung von Chymosin wird eine solche Lösung nicht koaguliert. Die proteolytische Wirkung dagegen ist vorhanden, denn wird eine so behandelte Lösung mit einem Kalksalz versetzt, so tritt unmittelbar Gerinnung ein. In der Lösung hat sich also aus dem Caseinogenkalk Caseinkalksalz gebildet. Setzt man noch ein Kalksalz hinzu, so fällt der unlösliche komplexe Caseinkalk aus. Die Kalksalze können durch Salze anderer zweiwertiger oder mehrwertiger Metalle ersetzt werden. Dagegen wirken die Salze der Alkalimetalle auf die Gerinnung hemmend, da sie die Bildung der Kalkverbindung zurückdrängen. Die Wirkung der Salze auf die Gerinnung kann natürlich sehr leicht eine Wirkung auf das Enzym vortäuschen.

Für das Studium des Chymosins wäre es am besten eine Methode anzuwenden, welche die Bestimmung der zu jeder Zeit gebildeten Menge Caseinkalk erlaubt. Eine ganz einwandfreie solche Methode gibt es gegenwärtig kaum. Sehr interessant ist doch in dieser Hinsicht eine von Rona und Gabbe[3] angegebene Methode: Sie fanden, dass bei bestimmter Menge $CaCl_2$ und bestimmter Acidität jede Mischung von Caseinogen und Casein eine bestimmte „Gerinnungstemperatur" zeigt. Durch Vergleich mit Mischungen von ungelabter und gelabter Milch bekannter Zusammensetzung konnten sie den prozentischen Anteil von Casein in der zu untersuchenden Probe ermitteln.

Zu nennen ist auch hier die Methode von Laqueur[4], wo eine Menge der komplizierten Verhältnisse bei der natürlichen Milch dadurch vermieden

[1] Bang, Ergebn. d. inn. Med. 9, 435; 1912.
[2] Siehe z. B. Arthus und Pagès, Arch. de Physiol. 2, 330, 540; 1890.
[3] Rona und Gabbe, Biochem. Zs 134, 39; 1922/23.
[4] Laqueur, Hofm. Beitr. 7, 273; 1905.

wird, dass er eine reine Caseinogenlösung verwendet und die Zunahme der inneren Reibung während der Reaktion bestimmt.

Die Notwendigkeit der Kalksalze für die Gerinnung geht sehr deutlich aus Versuchen mit sog. Oxalatmilch hervor. Wenn man mit Oxalat die Kalksalze der Milch ausfällt und dann den Überschuss des Oxalats durch Dialyse entfernt, so gerinnt die Milch nach Behandlung mit kalkfreier Lablösung nicht[1]. Setzt man dagegen Calciumchlorid zu, gerinnt sie sofort. Diese Gerinnung tritt in genau derselben Weise ein, wenn man zuerst das Enzym zerstört hat.

Über die Vertretbarkeit des Calciums liegen neue bemerkenswerte Beobachtungen und Messungen von Marui[2] vor. Durch einwertige Kationen kann Ca unter keinen Umständen ersetzt werden, „dagegen wirken alle zwei- und dreiwertigen Kationen in einer Weise, welche in höherem oder geringerem Grad mit der des Ca verglichen werden kann".

Auch ein weiterer Befund des gleichen Forschers: „Jede beliebige Suspension, welche an sich nicht stabil ist, und nur dadurch stabil wird, dass sie durch Casein geschützt wird, wird durch das Labferment zur Gerinnung gebracht", kann, wenn er sich bestätigt, Ausgangspunkt für weitere Fortschritte auf diesem noch dunklen Gebiet werden.

Eine ganz besondere Methode zur Messung der Chymosinwirkung wird von van Dam angewendet. Er bestimmt den Abbau des Caseinkalkes durch längere Einwirkung des Enzyms. Hier können also alle die modernen Methoden zur Messung der Eiweissspaltung zur Anwendung kommen. Die Zulässigkeit dieses Verfahrens fusst natürlich auf der Annahme, dass Chymosin eine Protease ist. Dies scheint ja sicher zu sein. Vielleicht ist es doch am besten durch Parallelbestimmungen nach dieser und einer Labungsmethode sich von der Übereinstimmung zu überzeugen.

Aciditätsbedingungen. Das pH-Optimum der Labgerinnung haben Michaelis und Mendelsohn untersucht[3]. Sie fanden, dass es bei Gegenwart von Kalk zwischen etwa $H = 4 \cdot 10^{-7}$ und 10^{-6} liegt. Sicher liegen die Punkte $3 \cdot 10^{-6}$ und $1 \cdot 10^{-7}$ ausserhalb der Optimalzone. Das Optimum der Säurefällung des Caseins in reiner Lösung oder in der Milch liegt dagegen bei $2{,}5 \cdot 10^{-5}$. Durch Gegenwart von Kalksalzen wird es deutlich nach der sauren Seite zu verschoben und unschärfer. Zwischen dem Optimum der Säurefällung und dem der Labfällung findet sich nach Michaelis eine Zone, in der das Casein weder durch Lab noch durch Säure optimal gefällt wird. „Die Labwirkung ist daher nicht eine Verbreiterung der Zone der allgemeinen Säurewirkung, sondern eine spezifische Wirkung; auch ist das Ca für die Labwirkung

[1] Arthus und Pagès, Arch. de Physiol. 2, 330, 540; 1890.
[2] Marui, Biochem. Zs 173, 371; 1926. — 173, 381; 1926.
[3] Michaelis und Mendelsohn, Biochem. Zs 58, 315; 1913/14.

durch vermehrte H-Ionen nicht ersetzbar." Die Verdauung des Paracaseinkalkes durch Chymosin hat auch ein Optimum bei sehr schwach saurer Reaktion. Es liegt nach van Dam[1] bei pH = etwa 5.

D. Kinetik und Hemmungen.

1. Zeitlicher Verlauf.

Über den zeitlichen Verlauf der Bildung von Casein aus dem Caseinogen kann nur weniges gesagt werden, da die älteren Methoden eine genaue Bestimmung der in Lösung befindlichen Caseinmenge nicht erlauben. Indirekt hat zuerst Fuld[2] das Zeitgesetz festzustellen versucht. Gibt man zu einer Mischung von Lab und Milch nach einer gewissen Einwirkungszeit eine neue Menge Milch, so wird nach Fuld die Gerinnungszeit nicht geändert. Dies bedeutet, dass auch bei Gegenwart der doppelten Milchmenge nach derselben Zeit dieselbe Menge Casein gebildet worden ist. Diese und andere Versuche sprechen dafür, dass die Bildung des Caseins gleichmässig verläuft, d. h. dass in gleichen Zeiten gleiche Mengen Caseinkalk entstehen. Wie die eigentliche Gerinnung von der gebildeten Caseinmenge abhängt, ist eine Frage, die auch noch nicht vollständig beantwortet werden kann. Die Gerinnung tritt bekanntlich sehr plötzlich ein. Dass indessen vor der Gerinnung eine Änderung des Zustandes des Caseins zustande kommt, zeigen z. B. Versuche über die Viscosität.

Man verdankt Gerber[3] eine grosse Reihe von Untersuchungen über die Geschwindigkeit der Milchgerinnung und Labwirkung, aber bis jetzt ist ein Eindringen in den enzymatischen Vorgang noch nicht gelungen.

2. Hemmungen.

Ausser den Hemmungen des Chymosins durch Säuren und Alkalien muss die irreversible Zerstörung des Enzyms vor allem durch OH-Ionen beachtet werden. So fanden Schmidt-Nielsen[4] und Moseley[5], dass schon so kleine Konzentrationen Hydroxylionen schädigen, dass oft die natürliche Milch das Enzym bei langen Versuchszeiten irreversibel inaktivieren kann.

Neutralsalze scheinen im allgemeinen die eigentliche Enzymwirkung zu hemmen. Auf die Gerinnung können sie einen ganz verschiedenen Einfluss ausüben. Die Kalksalze haben nicht nur für die Ausfällung des Caseins eine Bedeutung, sondern sollen auch in kleinen Konzentrationen die Enzymwirkung befördern[6].

---

[1] van Dam, H. 61, 147; 1909.
[2] Fuld, Hofm. Beitr. 2, 178; 1902.
[3] Gerber, Soc. Biol. 63.
[4] Schmidt-Nielsen, Upsala läkareffören. förh. 11, Suppl. 26; 1906.
[5] Moseley und Chapman, Proc. Linnean Soc. South Wales 31, 568; 1906.
[6] Rona und Gabbe, Biochem. Zs 134, 39; 1922.

Die Antiseptica wurden von Freudenreich untersucht[1]. Formalin und Chloroform sollen in kleinen Mengen recht bedeutungslos sein.

Glycerin hemmt[2].

In mehreren Arbeiten ist festgestellt worden, dass Peptone und ähnliche Stoffe auf die Chymosinwirkung einen stark verzögernden Einfluss haben. Sieht man in dem Chymosin eine Protease, so können vielleicht diese Hemmungen mit den bei anderen Proteasen bekannten Hemmungen durch die Reaktionsprodukte und ähnliche Stoffe in Zusammenhang gesetzt werden. Glykokoll soll nach Spiro hemmen[2].

Die Hemmungen der Labwirkung durch mehr oder weniger charakterisierte Stoffe aus lebenden Organismen sind natürlich hier in noch höherem Grade als bei anderen Proteasen schwer systematisch zu behandeln. Da im allgemeinen der ganze Labungsvorgang untersucht wurde, können die gefundenen Einwirkungen ebenso gern auf Beeinflussung der Caseinfällung beruhen wie auf eine Änderung der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit. Da die zugesetzten Stoffe oft kolloidal gelöst sind, können sie als Schutzkolloide die Ausfällung verhindern.

Labungshemmende Stoffe sind zuerst von Hammarsten und Rödén im normalen Serum gefunden worden[3]. Pferdeserum hemmt am kräftigsten, aber auch Ochsenserum, Kaninchenserum und Schweineserum zeigen eine ausgesprochene Hemmung. Der Hemmungskörper findet sich in der sog. Pseudoglobulinfraktion[4] (34—46% Ammonsulfat). Er passiert Chamberlandfilter. Die Hemmung wird aber nicht durch Dialyse des Serums aufgehoben.

Hedin hat die labungshemmenden Stoffe des Serums in mehreren Arbeiten untersucht[5]. Er fand, dass die Hemmungskörper durch Behandlung mit 0,1—0,2% HCl gelähmt oder zerstört wurden. Wichtig ist die Feststellung Hedins, dass die Hemmung durch normales Serum nicht artspezifisch ist. Hedin macht besonders auf die deutlichen Analogien aufmerksam zwischen den Hemmungen des Labs durch Serum usw. und den Hemmungen des Pankreastrypsins durch dieselben Stoffe. Auch hier hat Hedin ähnliche Hemmungserscheinungen durch bekannte Stoffe wie Kohle usw. hervorrufen können. Sehr interessant sind die Versuche Hedins, das sog. Labzymogen als inaktive Verbindung zwischen dem wirklichen Enzym und in der Magenschleimhaut vorkommenden Hemmungskörpern zu erklären[6]. Er fand, dass eine „Zymogenlösung“ (neutrale Infusion des Kalbmagens) immer wirksames Lab enthält. Dieses Lab zeigt indessen in seiner Wirkung gewisse Abweichungen von dem durch Salzsäureextraktion erhaltenen. Geringe

---

[1] Freudenreich, Zbl. f. Bakt. 4, 309; 1898.
[2] Spiro, Hofm. Beitr. 7, 485; 1905 und 8, 365; 1906.
[3] Hammarsten und Rödén, Upsala. läkerefören förh. 22, 546; 1887.
[4] Fuld und Spiro, H. 31, 132; 1900.
[5] Hedin, H. 60, 85; 1909; 60, 364; 1909; 63, 143; 1909; 74, 242; 1911.
[6] Hedin, H. 72, 187; 1911.

Enzymmengen geben eine verhältnismässig kürzere Gerinnungszeit. (Man erinnert sich hier der Versuche von Northrop über die in rohen Pepsinpräparaten vorkommenden Hemmungskörper, die eine vollkommen analoge Wirkung haben.) Hedin fand weiter, dass, wenn man das „Zymogen" kurze Zeit in 0,017 n NH_3 auf 37° erwärmt und dann neutralisiert, es seine labungserregende Wirkung eingebüsst hat und statt dessen die Wirkung zugesetzten Labs hemmt. Diese Hemmung ist der des Serums völlig analog und verschwindet durch kurze Behandlung mit Salzsäure. Eine Mischung von Lab und Serum, die eine schwache Labwirkung zeigt, weicht in derselben Weise wie das Zymogen von dem Enzym-Zeit-Gesetz ab. Eine solche Mischung verhält sich gegen HCl und NH_3 völlig wie das natürliche „Zymogen", das also nach Hedin nichts anderes ist als eine Mischung von Chymosin mit natürlichen Hemmungskörpern.

Das Antilab.

Die Existenz eines spezifischen Antienzyms ist auch hier recht zweifelhaft. Ausser einer Menge Substanzen, deren Wirkung auf völlig unspezifische Einflüsse zurückzuführen ist, gibt es Stoffe, welche streng spezifisch die Labwirkung zu hemmen scheinen. So verhalten sich nach Hedin die im sog. Zymogen vorhandenen Hemmungskörper[1]. Die daraus durch die Einwirkung von verdünntem Ammoniak erhaltenen Lösungen hemmten die Wirkung des arteigenen Labs, aber nicht anderer Labenzyme.

Eine andere Frage ist, ob dies die Verschiedenheit der Labenzyme verschiedener Tiere beweisen kann.

Immunantichymosin. Morgenroth[2] hat die labungshemmende Wirkung verschiedener Immunsera untersucht. Er konnte Antilabsera erhalten, die so stark wirkten, dass ein Zusatz der 200-fachen Enzymmenge nötig war um die Gerinnung hervorzurufen. Diese Körper wirken nicht auf die Labung durch Pflanzenproteasen. Hedin hat später den Immunantikörper studiert[3]. Er fand, dass derselbe auch nach Einspritzung des Zymogens erhalten wurde. Die Hemmungskörper des Zymogens verhindern also die Antikörperbildung nicht. Vielmehr werden jene nach Hedin als Material dabei verwendet. Die wichtigste Eigenschaft des Immunantichymosins ist die Artspezifität.

E. Einfluss der Temperatur auf die Labwirkung und die Stabilität des Chymosins.

1. Temperatur.

Das Chymosin wirkt am besten etwa bei Körpertemperatur. Fuld fand die „Optimaltemperatur" bei 45°. Es wirkt natürlich auch, obgleich schwächer

[1] Hedin, H 74, 242; 1911; 76, 355; 1912.
[2] Morgenroth, Zbl. f. Bakt. 27, 721; 1900.
[3] Hedin, H. 77, 229; 1912.

bei niedrigeren Temperaturen[1]. Wie bei allen Enzymen ist hier die Abhängigkeit der Wirkung von der Temperatur von zwei Faktoren zusammengesetzt: Die vergrösserte Reaktionsgeschwindigkeit und die vergrösserte Zerstörung.

Bei dieser speziellen Reaktion gilt ausserdem folgendes: Die Zeit der enzymatischen Gerinnung hängt von der Temperatur in anderer Weise ab als die enzymatische Spaltung des Caseinogens. Auch bei so tiefen Temperaturen, bei welchen keine Gerinnung eintritt, findet eine Umwandlung des Caseinogens statt. Dies hat Laqueur durch Messung der inneren Reibung bewiesen[2]. Die Abhängigkeit der Chymosinwirkung von der Temperatur haben Madsen und Walbum durch die Formel (vergl. I. Teil, S. 245 u. ff.)

$$\frac{K_1}{K_2} = C^{\frac{Q}{R} \cdot \frac{T_1 - T_2}{T_1 T_2}}$$

darzustellen versucht[3]. In drei Versuchen fanden sie $Q = 89130, 91200, 58330$.

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass gekochte oder auch nur erwärmte Milch langsamer gerinnt als rohe (Loevenhart[4]). Der analoge Effekt tritt auch bei reinen Caseinogen-Kalklösungen ein (Michaelis und Marui[5]), deren Koagulierbarkeit durch Erhitzen auf 100° ganz aufhört.

Nach Marui[6] beruht die schlechtere Gerinnbarkeit des gekochten Caseins unter der Wirkung des Chymosins nicht auf einer Erhöhung des Kalkbindungsvermögens des Caseins durch das Kochen. Die Wirkung des Erhitzens ist reversibel.

2. Stabilität.

Die Stabilität des Chymosins ist wie die der anderen Enzyme von der Acidität abhängig. Das Optimum liegt nach Versuchen, in welchen die Acidität noch nicht nach modernen Methoden bestimmt wurde, in schwach saurer Lösung. Wahrscheinlich fallen Aktivitätsoptimum und Stabilitätsoptimum einigermassen zusammen. Die Stabilität in Lösung hängt ausserdem von der Konzentration und natürlich in höchstem Grade von der Anwesenheit von enzymbindenden Stoffen ab. Die natürlichen Hemmungskörper spielen wahrscheinlich auch hier eine Rolle. Die „Zerstörungstemperatur“ bzw. „Tötungstemperatur“ ist nach Bang[7] für konzentrierte Lösungen beim Optimum etwa 65° (vgl. hierzu I. Teil, S. 272).

Glycerinlösungen sind wie gewöhnlich viel beständiger. Trockenpräparate vertrugen Erhitzen.

---

[1] König, Biochem. Zs 110; 266.

[2] Laqueur, Biochem. Zbl. 4, 334.

[3] Madsen und Walbum, Upsala läkarefẗören. förh. 11, Suppl. 24.

[4] Loevenhart, H. 41, 177; 1904. — (Siehe auch L. S. Palmer, Proc. Soc. exp. Biol. 19, 137; 1921.)

[5] Michaelis und Marui, siehe Jl exp. Med. 1, 45; 1922.

[6] Marui, Biochem. Zs 193, 368; 1926.

[7] Bang, Skand. Arch. Physiol. 25, 105; 1911.

Starkes Licht schädigt, vor allem die chemisch wirksamen Strahlen[1]. Dagegen sollen Röntgenstrahlen und radioaktive Strahlung wirkungslos sein.

F. Die Parachymosine.

Gehen wir davon aus, dass das echte Chymosin, das Kalbslab, ein selbständiges von Pepsin verschiedenes Enzym ist, so ist die Frage zu beantworten, warum alle Pepsinpräparate, auch die reinsten bisher dargestellten, Labwirkung zeigen. Andererseits haben alle Versuche über die labenden Enzyme der ausgewachsenen Tiere gezeigt, dass eine Trennung von Pepsin oder eine stärkere Abschwächung der einen Wirkung durch irgend einen Eingriff nicht gelungen ist. Anzuführen ist hier z. B. die Untersuchung von Michaelis und Rothstein[2]. Aus allen einschlägigen Arbeiten scheint hervorzugehen, dass die Labenzyme der älteren Tiere, die sog. Parachymosine, mit dem Pepsin untrennbar zusammenhängen. Es gibt nun zwei Möglichkeiten die Verhältnisse zu klären:

1. Die Parachymosinwirkung ist die gewöhnliche Pepsinwirkung, die nur dank besonderer äusserer Umstände in der Gerinnung zum Ausdruck kommt. Dies ist an und für sich nicht unmöglich, vielmehr wird eine Labwirkung allen Proteasen zugeschrieben. Indessen kommt nun der Umstand hinzu, dass das Optimum der Labung mit der der Pepsinwirkung nicht zusammenfällt. Hier zeigt sich wieder die Notwendigkeit, die Gerinnung und die Labwirkung zu unterscheiden. Es ist wohl möglich, dass die Wirkung des „Parachymosins“ das gewöhnliche Optimum des Pepsins zeigt, dass aber die Bedingungen für die Gerinnung bei einer anderen Acidität günstiger sind.

2. Die labende Wirkung der Parachymosine wird zwar von demselben Molekül ausgeübt wie die Pepsinwirkung, aber von anderen Gruppen, „Seitenketten“. Diese strukturell chemische Auffassung bietet zwar der modernen Enzymchemie keine Schwierigkeiten, da die Anschauungen über die strukturelle Bindung zwischen Enzym und Substrat immer mehr an Wahrscheinlichkeit gewinnen; die Frage ist aber, ob solche Annahmen in diesem Falle notwendig sind.

An eine elektrochemische Verschiedenheit des Pepsins und Parachymosins dachte zuerst Michaelis[3]. Nach seiner durch die neueren Arbeiten über Pepsin modifizierten Auffassung soll man sich die Sache so vorstellen, dass Pepsin als Säure die Eiweisskationen angreift, derselbe Molekül in nicht dissoziiertem Zustand als Lab das nicht dissoziierte Caseinogen spaltet. Diese Auffassung ist denkbar, weitere Versuche mit einer modernen, einwandfreien Methodik, besonders einer guten Bestimmungsmethode der Labwirkung müssen die Entscheidung bringen.

---

[1] Schmidt-Nielsen, Hofm. Beitr. 5, 355 u. 398; 6, 175; 1906; H. 58, 233; 1909.
[2] Michaelis und Rothstein, Biochem. Zs 105, 60; 1920.
[3] Michaelis, Biochem. Zs 17, 231; 1909.

G. Methoden zur Bestimmung der Labwirkung.

Man ermittelt die Verdünnung, bei welcher eine gewisse Menge Milch bei 40° in 30 Minuten zur Koagulation gebracht werden kann[1].

Da die für Labbestimmungen verwandte käufliche Milch hinsichtlich ihres Chymosingehaltes sehr stark variiert, so schlagen Blum und Fuld[2] vor, an Stelle der Milch ein Milchpulvergemisch anzuwenden, das fabrikmässig hergestellt wird und seiner Zusammensetzung nach konstant ist.

Von diesem Milchpulver werden 8 g mit dem neunfachen Gewicht Wasser zusammengebracht. Dies geschieht so, dass die abgewogene (oder in ausgewogenem Hohlmass unter Klopfen und Glattstreichen abgemessene) Menge Milchpulver in kleinen Portionen unter Umrühren in so viel destilliertes Wasser gegeben wird, dass ein halbflüssiger Teig entsteht, worauf der Rest des Wassers zugesetzt wird. Unter mässigem Umrühren geht nun fast alles in Lösung, ohne dass irgendwelches Erwärmen erforderlich wäre. Diese Lösung, deren Herstellung nur ein paar Minuten dauert, kann man ohne weiteres benutzen, wenn man nur das allerunterste fortlässt. Andererseits kann man sie im Eisschrank bis drei Tage aufbewahren. Jedenfalls ist ein Calciumzusatz, wie er von den Verfassern in der ersten Mitteilung verlangt wurde, nicht nötig.

Es werden nun 20 Röhrchen folgendermassen gefüllt:

Man nimmt von unverdünntem Magensaft folgende Mengen:

0,10; 0,15; 0,21; 0,32; 0,46; 0,68; 1,0;

von der zehnfachen Verdünnung:

0,1; 0,15; 0,21; 0,32; 0,46; 0,68;

von der hundertfachen Verdünnung:

0,1; 0,15; 0,21; 0,32; 0,46; 0,68.

Das zwanzigste Röhrchen bleibt zu Kontrollzwecken mit 1,5 ccm gekochtem reinen Saft reserviert.

Diese Proben, welche (abgesehen von der letzten) den Inhalt in einer Verdünnung von 1 : 10 bis 1 : 10000 enthalten (eine Vorprobe kann daher unterbleiben), werden in ein Wasserbad von Zimmerwärme, ein grosses Gefäss mit Wasser von 17,5° C gesetzt, worin sie zwei Stunden verbleiben.

Alsdann werden sie mit je einem Tropfen 20%iger Chlorcalciumlösung versetzt und in ein Wasserbad von 40° auf fünf Minuten übertragen. Das Verhältnis Mageninhalt : Milchpulverlösung in der schwächsten gerinnenden Mischung gibt direkt den Labwert des Mageninhalts an und damit zugleich dessen Fermentgehalt im allgemeinen.

Auf andere Methoden von Rona und Gabbe, sowie von Laqueur ist oben (S. 588) bereits hingewiesen worden.

[1] Glaessner, Hofm. Beitr. 1; 1901. — Hammarsten, H. 22, 103; 1893.
[2] Blum und Fuld, Berl. klin. Woch. 1905 und Biochem. Zs 4, 62; 1907.

25. Kapitel.

Chemische Vorgänge bei der Blutgerinnung.

Ob an der Gerinnung des Blutes ein Enzym, das Thrombin (Alex. Schmidt), beteiligt ist, lässt sich gegenwärtig weder bejahen noch verneinen. Die Entscheidung hängt in gewissem Sinne auch davon ab, wie wir ein Enzym überhaupt definieren. Deswegen habe ich auch hier dem vermutlich katalytisch wirkenden Stoff Thrombin nicht eine neue Bezeichnung geben wollen, welche ihn durch die Endsilbe ase als Enzym charakterisieren würde. Immerhin wird man in einer Monographie über die Chemie der Enzyme eine Darstellung des gegenwärtigen Standes des Thrombin-Problems erwarten, und deshalb seien also die neueren Forschungsergebnisse über die Chemie der Blutgerinnung kurz geschildert. Ältere Stadien der Entwicklung dieses Gebietes findet man in Monographien[1] und in Oppenheimers bekanntem Werk. — Siehe ferner Fuld und Spiro, Hofm. Beitr. 5; 1904.

A. Einleitung.

Die Lehre von der Blutgerinnung als enzymatischem Vorgang stützt sich auf die Untersuchungen von Alex. Schmidt[2] und von Olof Hammarsten[3]. Während von der Lehre Alex. Schmidts in ihrer ursprünglichen Form wenig mehr übrig geblieben ist, verdankt man Hammarstens Arbeiten als bleibende Resultate erstens die Einsicht, dass es sich bei der Blutgerinnung um die Umwandlung des Fibrinogens in Fibrin handelt, und zweitens die Isolierung des Fibrinogens. Dass die Blutgerinnung nur in Gegenwart von Kalksalzen verläuft, fanden 1890 Arthus und Pagès[4].

Über die Einzelheiten bzw. über die Teilvorgänge der Blutgerinnung bestehen viele verschiedene Auffassungen oder „Theorien“. Folgende Darstellung kann zur Einführung in das Gebiet und als Ausgangspunkt für spätere Besprechung besonderer Fragen im III. Teil dieses Werkes dienen.

Im kreisenden Blut kommt ein Eiweissstoff, Fibrinogen, vor, dessen Verwandlung in Fibrin die Blutgerinnung bedingt. Zur Überführung des Fibrinogens in Fibrin ist das Thrombin erforderlich, das als solches im kreisenden Blut nicht oder höchstens in ganz geringen Mengen vorkommt,

---

[1] Morawitz, Abderhaldens Handb. d. bioch. Arbeitsmeth. 5, 223; 1911. — Oppenheimers Handb. d. Biochemie, 2. Aufl., 4, 44; 1923.

[2] Alex. Schmidt, Arch. Anat. u. Physiol. 1861.

[3] Olof Hammarsten, Upsula Läkareför. förh. 1876. Arch. ges. Physiol. 17—19; 1878—1880.

[4] Arthus und Pagès, Arch de Physiol. (5) 2, 739; 1890.

welches vielmehr aus einer im Blutplasma oder in den Formelementen des Blutes vorhandenen Vorstufe, dem Prothrombin, entsteht. Dieser Übergang von Prothrombin in Thrombin ist derjenige Teilvorgang bei der Blutgerinnung, welcher die Mitwirkung von Kalksalzen erfordert. Ausser den Kalksalzen ist aber (wenigstens noch) eine andere in verschiedenen Gewebsextrakten befindliche sog. zymoplastische Substanz für den Übergang Prothrombin — Thrombin erforderlich, welche Morawitz als Thrombokinase bezeichnet hat. Als zymoplastische Substanz bzw. als Thrombokinase fungiert zweifellos das Kephalin (Howell und Mac Lean), das vielleicht durch andere ähnliche Stoffe vertreten werden kann. Eine wesentliche Komponente des Gesamtsystems scheint ausserdem das Antithrombin zu sein, welches den Übergang Prothrombin-Thrombin hemmt.

Die verschiedenen auf diesem Gebiete führenden Forscher haben sich leider nicht auf eine gemeinsame Nomenklatur einigen können, so dass eine Reihe von Synonymen existieren. Die folgende Zusammenstellung (nach Morawitz) erleichtert das Studium der verschiedenen Darstellungen.

Thrombokinase (Morawitz)	Thrombogen (Morawitz, Nolf)
= Cytozym (Fuld, Bordet)	= Plasmozym (Fuld)
= Thrombozym (Nolf)	= Serozym (Bordet)
= thromboplast. Substanz (Howell).	

Wir gehen nun dazu über, die Tatsachen in der auch früher befolgten Ordnung zu beschreiben.

B. Substrat und Reaktionsprodukt. Fibrinogen und Fibrin.

Das Fibrinogen, das ausser im Blutplasma noch in der Lymphe, im Magensaft und ferner im Knochenmark und in einigen Transsudaten vorkommt, stammt vermutlich aus der Leber[1]. Es gehört in die Klasse der Globuline ist aber durch gewisse Sondereigenschaften gegenüber den übrigen Globulinen gekennzeichnet. Es ist eine im feuchten Zustand elastische Masse, die sich in verdünnter Kochsalzlösung auflöst, durch konz. Kochsalz aber gefällt wird. Hinsichtlich der Lösungs- und Fällungs-Konzentrationen unterscheiden sich die Fibrinogene verschiedener Herkunft. Spez. Drehung $[\alpha]_D = -52,5^0$. Ausgangsmaterial ist Pferdeleber, mit so viel Oxalat versetzt, dass es 0,3% Oxalat enthält. Man zentrifugiert die Formelelemente des Blutes ab und lässt wenigstens 20 Stunden bei 0° stehen. Nach Hammarsten wird Fibrinogen dargestellt, indem man Blutplasma mit dem gleichen Volumen gesättigter 0,5—1%-iges Kaliumoxalat enthaltender Kochsalzlösung fällt, den Niederschlag in 8%iger NaCl-Lösung wieder aufnimmt und in dieser Weise

[1] Literatur über die Beziehungen zur Leber: Doyon, Journ. de Physiol. et Path. 14, 229; 1912. — G. H. Whipple, Amer. Cl. Physiol. 33, 50; 1914. — K. Hiruma, Biochem. Zs 139, 152; 1923.

mehrere Male umfällt[1]. Die Trennung von dem das Fibrinogen begleitenden Fibringlobulin geschieht nach einem von Huiskamp[2] angegebenen Verfahren mittels konz. Natriumfluoridlösung.

Das aus dem Fibrinogen durch Schlagen entstandene Fibrin (Faserstoff) besitzt im allgemeinen die Lösungseigenschaften der koagulierten Eiweissstoffe; es ist in Wasser sowie in Alkohol unlöslich. Hammarsten macht ferner folgende Angaben: In Salzsäure von 1 ‰ wie auch in Kali resp. Natronlauge von 1 ‰ quillt er stark zu einer gallertähnlichen Masse auf, die bei Zimmertemperatur erst nach mehreren Tagen, bei Körpertemperatur zwar leichter, aber jedenfalls auch nur langsam sich löst. Bei der Lösung in Alkali findet eine Denaturierung unter Ammoniakabspaltung statt. Von verdünnten Neutralsalzlösungen kann der Faserstoff nach längerer Zeit bei Zimmertemperatur, bei 40° viel leichter gelöst werden (vielleicht unter Mitwirkung von Enzymen, Trombolysin, Rosenmann[3]).

Was nun den Chemismus der Blutgerinnung, also der Umwandlung Fibrinogen-Fibrin betrifft, so sind die verschiedensten Meinungen geäussert worden und eine Entscheidung lässt sich um so weniger geben, als gerade diejenigen Versuche, welche eine solche herbeiführen oder wenigstens erleichtern könnten, fehlen. Die frühere, von mehreren Autoren vertretene Ansicht, dass das Fibrin durch hydrolytische Spaltung des Fibrinogens entsteht, hat sich nicht aufrecht erhalten lassen. Andere Forscher nahmen an, dass sich das Fibrinogen mit einem weiteren Protein verbinde, so dass das Fibrin einen Komplex zweier oder mehrerer Proteine darstellt (Nolf[4], Mills[5], Perutz und Rosemann[6]), oder dass das Fibrinogen durch Lipoide ausgeflockt wird (Zak[7], E. Zunz[8]). Auch die Vertreter dieser Auffassungen waren nicht imstande, überzeugende Beweise beizubringen.

Nach einer von Hekma[9] aufgestellten und eingehend begründeten Theorie handelt es sich bei der Fibrinogen-Gerinnung im wesentlichen um eine Überführung des Alkalisalzes Fibrinogen in den entsprechenden isoelektrischen Stoff, für welchen nach allgemeinen Erfahrungen aus der Eiweiss-Chemie eine geringere Löslichkeit vorausgesetzt werden kann. Dass der Eintritt des isoelektrischen Punktes wie für die Eiweissflockung überhaupt so auch

---

[1] Nähere Angaben bei Hammarsten, H. 22, 333; 1896. — Nach Heubner (Arch. exp. Path. u. Pharm. 49, 229; 1903) geschieht die Fällung am besten in neutraler, die Wiederauflösung bei schwach alkalischer Reaktion.

[2] Huiskamp, H. 46, 182.

[3] Rosenmann, Biochem. Zs 128, 372; 1922. — 129, 101; 1922. (Hemmungskörper der Fibrinolyse, von Rosenmann als Thromboligin bezeichnet).

[4] Nolf, Arch. intern Physiol. 3—7; 1908—1909.

[5] Mills, Jl Biol. Chem. 46, 135, 167; 1921. — Mills und Mathews, Arch. int. Physiol. 24, 73; 1924.

[6] Perutz und Rosemann, Biochem. Zs 92, 90; 1918.

[7] Zak, Arch. f. exp. Path. 97, 499; 1923.

[8] Zunz, Soc. Biol. 87, 385; 1922.

[9] Hekma, Biochem. Zs 62—77; 1913—1916. — 143, 105; 1923.

in diesem speziellen Fall der Fibrinogen-Ausfällung eine wesentliche Rolle spielt, kann wohl kaum bezweifelt werden, und so gehen nunmehr mehrere Forscher besonders Stuber[1], Wöhlisch[2] und Kugelmass[3] in ihren theoretischen Darlegungen von diesem Prinzip aus. Ausführliche Referate ihrer Theorien würden hier zu weit führen. Nach einer neueren Arbeit von Hekma (Biochem. Zs 143) soll die Fibrinbildung eine unter dem Scheinbilde eines Kristallisationsprozesses verlaufende Dehydratation + Agglutination von Fibrinogenamikronen sein. Das Thrombin wäre kein (Fibrin-)Ferment, sondern ein Agglutinin. Fibrinogen + Agglutinin = Fibrin.

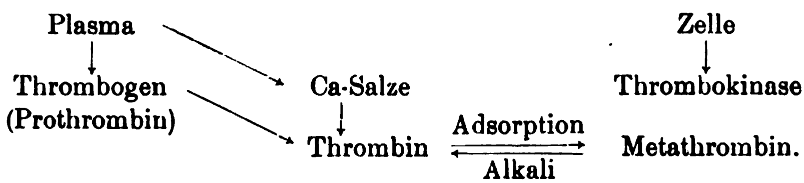
Die Fibringerinnung ist nach Hekma ein Agglutinationsprozess. Über den chemischen Vorgang wird dadurch offenbar nichts ausgesagt. Morphologisch findet Hekma Analogien zur Caseingerinnung.

C. Vorkommen und Gewinnung des Thrombins und der übrigen an der Blutgerinnung mitwirkenden Substanzen.

Derjenige Stoff, welcher das Fibrinogen in Fibrin überführt, wirkt vielleicht als Katalysator und wird oft noch als Enzym betrachtet[4]. Wenn ich im folgenden diesen Stoff, das Thrombin, als Enzym bezeichne, so geschieht es unter wiederholtem Hinweis auf die Bedenken, welche gegen die Enzymnatur des Thrombins vorgebracht worden sind.

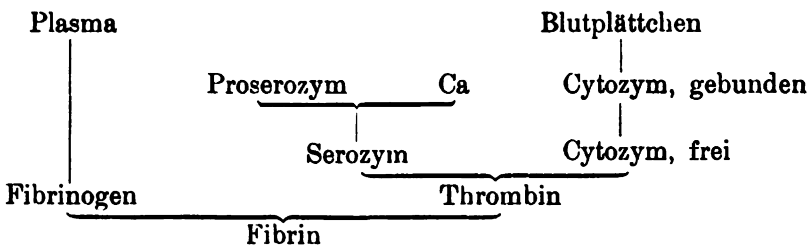
Man nimmt an, dass sich das Thrombin nicht in wirksamer Form im kreisenden Blut befindet, sondern als sog. Prothrombin = Serozym oder aber (nach Bordet) als Proserozym. Zur Klärung der Begriffe sei hier zunächst das von Morawitz gegebene Schema (l. c. S. 54) der Gerinnung wiedergegeben:

Morawitz:



Diesem Schema sei Bordets schematische Darstellung angereiht, nach welcher an der Thrombin-Bildung 3 Stoffe zusammenwirken:

Bordet:



---

[1] Stuber und Mitarbeiter, Biochem. Zs. 77—155; 1924. — Stuber, Fr. Focke und Chien Shen 157, 156; 1925. — Klin. Wochenschr. 1922, 2486.

[2] Wöhlisch, Biochem. Zs 145—159; 1925

[3] Kugelmass, Arch. intern. Physiol. 21, 139; 1923.

[4] Siehe aber z. B. Morawitz, Oppenh. Handb. l. c., S. 61.

Die Vorstufe des Thrombins findet sich ausser im Plasma im Knochenmark. Yamada[1] nimmt hingegen an, dass das Prothrombin im Knochenmark schon zu Thrombin aktiviert ist. Auch Lymphe enthält nach Howell[2] Prothrombin (auch die übrigen zur Gerinnung erforderlichen Komponenten können diesem Forscher zufolge in der Lymphe vorhanden sein).

Darstellung des Thrombins. Hammarsten[3] entfernt aus Serum die Globuline durch Magnesiumsulfat, verdünnt das Filtrat mit Wasser und fällt nun das Thrombin mit Magnesiumhydroxyd, oder er verwendet entkalktes Serum und dialysiert. Die nach seinen Verfahren dargestellten Thrombinlösungen enthalten nur noch 0,3—0,4 ‰ feste Stoffe.

Nach der Methode von Howell[4] wäscht man Fibrin aus Schweineblut in fliessendem Wasser mehrere Stunden unter Kneten aus, bis alles Hämoglobin entfernt ist. Die weisse Fibrinmasse wird dann fein verteilt, während 2—3 Tagen in eisgekühlter Kochsalzlösung extrahiert und schliesslich koliert und filtriert. Aus dem trüben, stark thrombinhaltigen Filtrat entfernt man die Eiweisskörper, indem man es mehrmals mit dem halben Volumen Chloroform auf der Schüttelmaschine durchschüttelt und filtriert (Chloroformniederschlag bleibt auf dem Filter). Nach wiederholtem Schütteln und Filtrieren erhält man schliesslich eine wasserklare sehr eiweissarme Lösung mit kräftiger Thrombinwirkung. Durch schnelles Eintrocknen der Lösung bei 35°—40° erhält man ein haltbares Präparat, das in physiologischer Kochsalzlösung wieder eine wirksame Lösung gibt.

Neuerdings macht Bleibtreu[5] in einer bemerkenswerten Mitteilung auf ein bereits 1909 von J. Mellanby angegebenes Verfahren zur Thrombindarstellung aufmerksam, und er beschreibt das Verfahren, wie er es anwendet, folgendermassen:

Gut zentrifugiertes Oxalatplasma wird abgemessen. Mindestens die 10-fache Menge destillierten Wassers bereitgestellt und dieser ungefähr $^1/_{30}$ des Volumens des Oxalatplasmas an Normalessigsäure zugesetzt. Diesem schwach essigsauren Wasser wird dann die abgemessene Menge Oxalatplasma unter Umrühren zugesetzt.

Nach 1—2 Stunden hat der Fibrinogenniederschlag sich so weit abgesetzt, dass die darüberstehende Flüssigkeit abgegossen werden konnte. Dann wird aufs neue eine grosse Menge destillierten Wassers zugesetzt und durchgerührt. Es dauert diesmal etwas länger, bis sich der Niederschlag hinreichend abgesetzt hat. Die überstehende, nunmehr schon fast farblose Flüssigkeit wird abgegossen, der Niederschlag auf ein Filter gebracht und nach Ablaufen des Restes der Flüssigkeit noch einmal mit destilliertem Wasser durchgespült.

Dann wird nach Abtropfen des Waschwassers durch mässiges Auspressen der Niederschlag noch nach Möglichkeit von anhaftender Flüssigkeit befreit und alsdann unter Zerdrücken der zusammengeballten Massen in so viel destilliertem Wasser suspendiert, als etwa $^2/_3$ des angew. Oxalatplasmas entspricht.

---

1 Yamada, Biochem. Zs 87, 273; 1918.

2 Howell, Amer. Jl Physiol. 35, 483; 1914.

3 Hammarsten, H. 22, 333; 1896. — 28, 98; 1899. Weitere Angaben bei Morawitz, Abderhaldens Handb. d. Biochem. Arbeitsmethoden 5.

4 Howell, Amer. Jl Physiol. 26, 1; 1910.

5 Bleibtreu, Pflüg. Arch. 213, 642; 1926.

Zur Kinasebereitung bevorzugt Bleibtreu Stierhoden.

„Da die Bildung des Thrombins bei erhöhter Temperatur schneller vor sich geht als bei Zimmertemperatur, wurde die Suspension des Fibrinogens in Wasser in einem Wasserbad auf 30° gebracht, durch Zusatz von 1/40 des Volumens gesättigter NaCl-Lösung das Fibrinogen in Lösung gebracht...

Dann wurde der Gewebsextrakt, inzwischen auch auf etwa 30° erwärmt, zugesetzt und zwar in ziemlich reichlicher Menge, etwa 1/4—1/6 des Volumens der angewandten Fibrinogenlösung und dann endlich etwa 1/60 des Volumens 1%-iger $CaCl_2$-Lösung zugefügt. Das Ganze gut umgerührt, bleibt dann bei 30° stehen. Meistens beginnt nach 2—5 Minuten die Gerinnung und nach nicht langer Zeit gesteht die ganze Masse zu einem weissen, festen Gerinnungsklumpen...

Nach Eintritt der Gerinnung bleibt dann nichts weiter zu tun übrig als aus diesem Gerinnungsklumpen die Flüssigkeit abzupressen und vom entstandenen Fibrin zu trennen." Bleibtreu findet es am besten, bald nach den ersten Anfängen der Gerinnung durch Rühren mit dem Glasstab zu defibrinieren. Dann lässt sich der grösste Teil der Flüssigkeit von Fibrin abgiessen und der Rest aus dem Fibrinklumpen mit der Hand auspressen. Die so gewonnenen Lösungen „haben nun tatsächlich die erstaunlich grosse, von Mellanby ihnen zugeschriebene Gerinnungswirkung auf Fibrinogenlösungen, sowie auch auf Oxalatplasma" (Wirksamkeit siehe S. 603).

Was die weitere Reinigung der Thrombinlösungen betrifft, so empfiehlt sich nach Bleibtreu die von Howell angegebene Chloroform-Aceton-Methode.

„Wenn eine Eiweisslösung mit einer nicht zu kleinen Menge Chloroform geschüttelt wird, entsteht eine Emulsion, an die ein grosser Teil des Eiweisses adsorbiert wird; wenn Thrombin neben Eiweiss vorhanden ist, so bleibt das Thrombin grossenteils in Lösung Wenn eine eiweisshaltige Thrombinlösung mit dem gleichen Volumen Aceton gemischt wird so wird mit dem grössten Teil des Eiweisses auch das Thrombin ausgefällt. Durch die Acetonfällung wird aber das Eiweiss in Wasser unlöslich bzw. schwer löslich, während das Thrombin sich aus dem Niederschlag mit Wasser auswaschen lässt."

Die Rohthrombinlösung wird demgemäss mit Aceton gefällt, dann wird die Acetonfällung mit Wasser ausgezogen und die noch vorhandenen Eiweissreste werden durch Ausschütteln mit Chloroform entfernt.

Die Adsorbierbarkeit des Thrombins an Casein wurde von Bleibtreu und Atzler[1] zu Reinigungsversuchen verwendet.

Unter anderen Verfahren mag noch ein neuerdings von Tsunoo[2] angegebenes erwähnt werden: Er adsorbiert das Thrombin aus Serum durch Casein, das er im Serum unter Schütteln auflöst. Dann wird das Casein durch Essigsäure ausgefällt; man verdünnt mit Wasser auf das 2—3-fache Volumen. dekantiert die oben stehende Flüssigkeit ab, verdünnt nochmal, zentrifugiert, trocknet den Niederschlag im Exsiccator und pulverisiert das Thrombinpräparat. Mit 94%-igem Alkohol kann eine weitere Reinigung vorgenommen werden.

Thrombokinase (Thrombozym nach Nolf).

Die Thrombokinase findet sich in den Blutplättchen und wird von diesen an das Serum abgegeben. Demgemäss enthält das Plasma stets ein wenig Thrombokinase.

[1] Bleibtreu und Atzler, Pflüg. Arch. 181, 340; 1920. — Bleibtreu, ebenda 194, 318; 1922.

[2] Tsunoo, Pflüg. Arch. 205, 255; 1924.

Die Tatsache, dass Vogelblut (im Gegensatz zu Säugetierblut) nur sehr schwer gerinnt, lässt sich demgemäss auf den Mangel an echten Blutplättchen zurückführen.

Ferner findet sich Thrombokinase in Leukocyten (Bordet[1], Austin und Pepper[2], Nolf[3]).

Bemerkenswert ist, dass nach Morawitz, Bordet u. a. auch in Organgeweben bzw. in deren Extrakten Thrombokinasen vorkommen (nicht aber fertiges Thrombin wie Leo Loeb[4] annahm). Über die Identität dieser Gewebskinasen mit denjenigen der Blutplättchen sind die Meinungen geteilt. Thrombokinasemangel bei der Hämophilie siehe S. 607.

Darstellung der Thrombokinasen aus Geweben. Morawitz[5] schüttelt gleiche Mengen Organbrei (z. B. Leberbrei) 20 Minuten mit Kochsalzlösung, kühlt die Lösung mehrere Stunden im Eisschrank ab und dekantiert. Diese trüb aussehende Kochsalzlösung verwendet er zu den Gerinnungsversuchen.

Batelli[6] stellt Thrombokinase aus Brei von Pferde- oder Hammellunge dar, rührt mit dem doppelten Volumen Wasser an, koliert, säuert mit Essigsäure an, zentrifugiert den Niederschlag, neutralisiert, setzt Alkohol zu und trocknet im Vakuum.

Cecil[7] stellt das Howellsche Thromboplastin aus getrocknetem Thymusbrei durch Glycerinextraktion dar.

Kinasen (Koaguline) kommen nach Leo Loeb[8] in Geweben von Avertebraten zusammen mit vollständigem Thrombin vor.

Die Hemmungskörper.

Die Hemmungskörper werden zum Teil als Anti-Thrombine, teils als Anti-Kinasen angesehen und bezeichnet.

Anti-Thrombine, welche die Bildung des Thrombins verhindern bzw. hemmen, sollen im Blut selbst, im Plasma und im Serum vorkommen[9]. Es soll sich um eine thermolabile Substanz von Proteincharakter handeln.

Unter den Säugetierblut-fremden Hemmungskörpern, die zu den eigentlichen Anti-Thrombinen gehören, ist nach Morawitz, Gratia[10] u. a. das

[1] Bordet und Delange, Ann. Inst. Pasteur, 26, 657 und 737; 1912.
[2] Austin und Pepper, Arch. of intern. Med. 11, 305; 1913.
[3] Nolf, Arch. Néerl. de Physiol. 7, 348.
[4] Leo Loeb, Hofm. Beitr. 5—9; 1906/07.
[5] Morawitz, Abderhaldens Handb. d. Biochem. Arbeitsmeth. 5, 223 u. zw. 278; 1911.
[6] Batelli, Soc. Biol. 68, 789; 1910.
[7] Cecil, Amer. Jl Physiol. 29, 156; 1911.
[8] Leo Loeb, Biochem. Zs 24, 479; 1910.
[9] Literatur hierzu: Collingwood und Mac Mahon, Jl of Physiol. 45, 119; 1912. — 47, 44; 1913. — Minot, Amer. Jl Physiol. 39, 131; 1915. — Denny und Minot, Amer. Jl Physiol. 38, 233; 1916. — Nolf, Ann. Inst. Pasteur, 31, 155; 1917. — Gratia, Ann. Inst. Pasteur, 35, 513; 1921.
[10] Gratia, Soc. Biol. 83, 311; 1921.

von J. B. Haycraft[1] entdeckte Hirudin zu zählen, das von Franz[2] und neuerdings von E. Zunz[3] eingehend studiert wurde.

Anti-Thrombine bzw. Anti-Kinasen spielen nach Howells Theorie eine wesentliche Rolle beim Gesamtvorgang der Blutgerinnung[4].

Als Hauptquelle dieser Hemmungsstoffe wird die Leber angegeben.

Ein wertvolles Resultat neuerer Arbeiten von Howell scheint die Aufklärung über die Mitwirkung des Heparins[5] zu sein, welches Howell als eine notwendige Ergänzung eines im Blut vorhandenen Pro-Anti-Thrombins ansieht. Neuerdings hat Howell dieses Heparin weitgehend gereinigt und hält es für eine gepaarte Glukuronsäure von Glukosid-Struktur, die Schwefelsäure und eine noch unbekannte Stickstoff-Komponente enthält.

Hemmungskörper, in denen Morawitz[6] Anti-Kinasen vermutet, kommen in Schlangengiften vor.

D. Eigenschaften des Thrombins und der Thrombokinasen.

1. Thrombin.

Wirksamkeit von Thrombinlösungen. Bleibtreu[7] gibt in dankenswerter Weise auch Zahlen für die Wirksamkeit seiner nach Mellanby (vgl. S. 600) dargestellten Lösungen. Als eine gute mittlere Wirkung betrachtet er diejenige einer Thrombinlösung, welche mit dem gleichen Volumen Rinderoxalatplasma vermischt, in weniger als 10 Sekunden den Anfang der Gerinnung zeigten, woran sich sehr schnell eine feste Gerinnung der ganzen Masse anschloss. Bisweilen erfolgte der Anfang der Gerinnung auch schon in 4 Sekunden.

Für ein nach dem Verfahren von Howell mit Chloroform und Aceton hergestelltes Präparat macht Bleibtreu folgende Angaben:

In einer 0,05%-igen wässerigen Lösung gibt es, mit gleichen Teilen Rinderoxalatplasma versetzt, in meist weniger als 10 Sekunden Gerinnung. — Biuretreaktion positiv. Die Analyse ergab 4,7% Asche. Die Analyse des organischen Teiles ergab annähernd Proteinzusammensetzung.

Hochgereinigte Lösungen scheint ferner Howell erhalten zu haben[8]. Wie schon erwähnt, sind seine besten Thrombinlösungen fast frei von gerinn-

[1] Haycraft, Arch. f. exp. Path. 18, 209; 1884.
[2] Fr. Franz, Arch. f. exp. Path. 49, 342; 1903.
[3] E. Zunz und M. van Geertruyden-Bernard, Arch. intern. de Physiol. 20, 79; 1922.
[4] W. H. Howell, Amer. Jl Physiol. 29, 187; 1911. — 31, 1; 1912.
[5] W. H. Howell, Amer. Jl Physiol. 63, 434; 1922.
[6] Morawitz, D. Arch. f. klin. Med., 80, 340; 1904.
[7] Bleibtreu, Pflüg. Arch. 213, 642; 1926.
[8] Howell, Amer. Jl Physiol. 26; 1910. — Siehe auch Wöhlisch und Paschkis, Zs exp. Med. 40, 121; 1924.

barem Eiweiss und ferner phosphorfrei. Durch Fibrin[1] und ausserdem durch Calciumphosphat (Bordet) wird es stark adsorbiert.

Der erreichte Reinheitsgrad dürfte immerhin noch nicht so gross sein, dass sich aus der (anodischen) Wanderung im elektrischen Strom Schlüsse ziehen lassen[2]. Howell[3] fand seine Präparate in wässriger Lösung thermolabil.

2. Thrombokinasen (Zymoplastische Substanzen).

Für den Proteincharakter der Plasma-Kinase hatten sich Morawitz und Collingwood[4] ausgesprochen.

Ohne die Literatur hier ausführlich referieren zu wollen — dies würde selbst bei Beschränkung auf die letzten Jahre zu weit führen — kann zusammenfassend gesagt werden, dass die Kinasen Phosphatide sind (Howell, Bordet[5], Zak[6], Waksman[7] u. a.).

Hier ist insofern ein weiterer chemischer Anhaltspunkt gefunden, als das chemisch ziemlich gut charakterisierte Kephalin, ein ätherlösliches Monophosphatid 1 N : 1P wirksam befunden wurde; die Ergebnisse verschiedener Forscher gehen darüber auseinander, ob reines Kephalin (Mac Lean[8]) oder die Mischung desselben mit Lecithin (Gratia und Levene[9]) am wirksamsten ist.

Zunz und La Barre[10] nannten eine aus Kephalin gewonnene sehr wirksame Fraktion Cytozymin.

Die zymoplastische Wirksamkeit von Aminosäuren ist in letzter Zeit besonders eingehend von E. Zunz studiert worden, welcher nunmehr als wirksamen Aktivator einen Komplex aus einem Lipoid und einer Aminosäure (bzw. Peptid oder Albumose) annimmt.

E. Kinetische Probleme.

Die bis jetzt vorliegenden Messungen sind über das Stadium der ersten Orientierung kaum hinausgekommen; Reaktionskonstanten sind erst in einigen Fällen berechnet worden und demgemäss sind auch die Konzentrationsfunktionen der an der Fibrinogen-Gerinnung beteiligten Stoffe noch wenig bekannt. Vor allem steht noch die Frage offen, was als Mass der Reaktion gewählt werden soll.

---

[1] Gessard, C. r. 150, 1617; 1910. — Foà, Arch. di Fisiol. 10, 479; 1912. — Es dürfte sich die Methodik von R. Fricke (Koll. Zs 39) empfehlen.

[2] Resch, Biochem. Zs 78, 297; 1917.

[3] Howell, Amer. Jl Physiol. 31, 1; 1912. — 32, 264; 1913.

[4] Collingwood und Mac Mahon, Jl of Physiol. 47, 44; 1913.

[5] Bordet und Delange, Arch. f. exp. Path. 71, 295; 1913.

[6] Zak, Arch. f. exp. Path. 70, 27; 74, 1; 1912/13. — 97, 499; 1923.

[7] S. A. Waksman, Amer. Jl Physiol. 46, 375; 1918.

[8] Mac Lean, Amer. Jl Physiol. 41, 250. — 43, 586; 1917.

[9] Gratia und Levene, Jl Biol. Chem. 50, 455; 1922.

[10] Zunz und La Barre, Arch. intern. de Physiol. 18, 116; 1922. — Soc. Biol. 90, 655; 1924.

Unter denjenigen Methoden, welche bis jetzt für kinetische Messungen angewandt wurden, dürften Viscositätsbestimmungen und evtl. nephelometrische Bestimmungen entwicklungsfähig sein. Diesbezügliche Daten findet man bei Kugelmass, dessen Arbeit wir die folgende Figur 91 entnehmen.

Da die Ausfällung des Fibrins vermutlich nahe mit seinem Ladungszustand zusammenhängt, ist eine genaue Bestimmung der Acidität in den Reaktionslösungen natürlich unerlässlich. In alkalischen Lösungen ist die Blutgerinnung gehemmt; genauere Angaben über das Aciditäts-Optimum der Gerinnung haben Kuwashima[1], Tsunoo[2] und Zunz[3] sowie besonders Kugelmass gemacht. Hiernach würde das Optimum (für 38°) bei etwa pH = 7 liegen, nahe am isoelektrischen Punkt des Fibrins (pH = 7,2). Weitere Versuche sind wünschenswert. Nach Kugelmass ändert sich die Acidität bei der Fibrinogen-Gerinnung wesentlich; der genannte Forscher kommt zum Resultat, dass das Reaktionsprodukt Fibrin saurer ist als das Fibrinogen. Dagegen findet E. H. Hirsch[4], dass während der Gerinnung die Acidität der Lösung zunimmt.

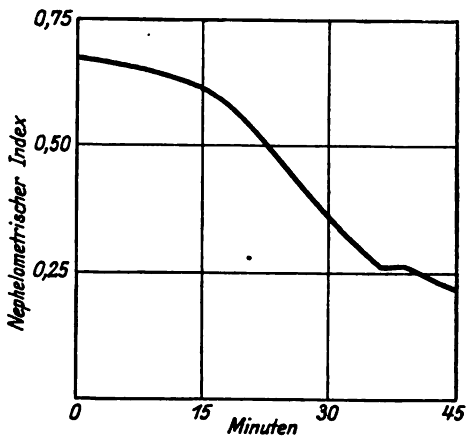


Fig. 91.

Vermutlich kompliziert sich der Einfluss der Acidität dadurch, dass — wie bei den Proteolysen — sowohl das Substrat als das Katalysator-System durch Salzbildung vom Aciditäts- bzw. Alkalinitätsgrad der Lösung abhängig ist.

Von grösster Bedeutung für die Ausfällung des Fibrins sind die Neutralsalze.

Man hat hier zu unterscheiden a) die nicht kalkfällenden Salze, b) die kalkfällenden Salze.

Was erstere Gruppe betrifft, so steht fest, dass die Neutralsalze einwertiger Ionen die Thrombinwirkung hemmen.

Unter den zweiwertigen Kationen ist $Mg^{\cdot\cdot}$ zu nennen.

Wie schon einleitend hervorgehoben, spielen die Ca-Salze eine ganz besondere Rolle. Man unterscheidet zwei Wirkungen:

1. Die Beschleunigung der Thrombinbildung durch Kalksalze.
2. Die Umsetzung mit dem Fibrinogen.

[1] Kuwashima, Jl of Biol. 3, 91, 1923.
[2] Tsunoo, Pflüg. Arch. 205, 255; 1924.
[3] E. Zunz und La Barre, Soc. Biol. 85, 1107; 1921.
[4] E. H. Hirsch, Jl Biol. Chem. 61, 795; 1924.

Was letzteren Einfluss betrifft, so wechselt derselbe mit der Salzkonzentration, und zwar geht der fördernde Einfluss kleiner Calciumsalzmengen in eine Hemmung bei grösserer Konzentration derselben über[1,2]. Nach Hammarsten[1] liegt die Grenze etwa bei 0,1 % Ca.

Da die Calciumsalze in erster Linie die Thrombin-Bildung beeinflussen, so gilt das gleiche, natürlich in umgekehrtem Sinne, für die kalkfällenden Salze, besonders Oxalate und Fluoride, ferner auch Citrate. Auch die Hemmung durch die gallensauren Salze dürfte auf den von ihnen bewirkten Calcium-Entzug zurückzuführen sein.

Bleibtreu (Pflüg. Arch. 213) findet in seinen zuverlässigen Versuchen angenäherte Proportionalität zwischen Gerinnungsgeschwindigkeit und Thrombinmenge.

F. Einfluss der Temperatur.

Der Einfluss der Temperatur auf die Stabilität des Thrombins ist insofern von besonderem Interesse, als sich daran die Frage knüpft, ob das Thrombin den Enzymen zuzuzählen ist oder nicht.

Die exakte Bestimmung dieses Temperatur-Einflusses ist dadurch erschwert, das bis jetzt Reaktionskonstanten sich noch nicht haben berechnen lassen.

Hiruma[3] gibt an, dass das Thrombin in wässriger Lösung schon bei 15° in 24 Stunden um 50% an Wirksamkeit abnimmt; es würde also in dieser Zeit zur Hälfte zerstört werden. Dazu wäre in erster Linie noch die Angabe der Acidität der Lösung erforderlich. Schwer vereinbar ist mit dieser Angabe die Beobachtung von Blaizot[4], dass Thrombin kurzes Erhitzen auf 100° überdauern soll, sofern hier eben nicht die Aciditätsverhältnisse viel günstigere waren.

Was dann den Einfluss der Temperatur auf die Geschwindigkeit der Gerinnung betrifft, so fand Kugelmass folgende Zahlen:

Temperatur Grade	Koagulationszeit in Minuten
39	25
35	35
20	50
8	90
4	125

Die Berechnungen und Erörterungen, die Kugelmass an diese Zahlen knüpft, sind nicht ohne weiteres verständlich.

[1] Hammarsten, H. 22, 333; 1896. — Horne, Jl of Physiol. 19, 356; 1896.
[2] Fleig und Lefèvre, Jl de Physiol. Path. 4, 615; 1902.
[3] Hiruma, Biochem. Zs 139, 152; 1923.
[4] Blaizot, Soc. Biol. 71, 447; 1911.

Die Angaben von Rettger, Howell, Stromberg und Bleibtreu stimmen dahin überein, dass eine Steigerung der Gerinnungsgeschwindigkeit nur zwischen 0° und 15° eintritt, während zwischen 15° und 40° der Temperatureinfluss sehr gering ist; hier kompensieren sich vermutlich 2 Einflüsse.

Eine Optimal-Temperatur geben Simson und Rasmussen bei 38—40° an, Yamada[1] bei 37° (Thrombin aus Knochenmark).

G. Zur Pathologie der Blutgerinnung. Hämophilie.

Die Hämophilie wird von der grossen Mehrzahl der Forscher auf den Mangel an Thrombin, zurückgeführt[2], welcher seinerseits einer Störung der Thrombinbildung zuzuschreiben ist. Es steht nämlich fest, dass der Fibrinogengehalt des hämophilen Blutes normal ist. Wesentlich ist ferner die Tatsache, dass das Blut von Hämophilen durch normale Gewebskinase koaguliert wird (Morawitz, H. Schloessmann).

Als Ursache der gestörten Thrombinbildung dürfte zufolge der von Sahli zuerst geäusserten Ansicht der Mangel an Thrombo-Kinase anzusehen sein. Für diese Auffassung sprechen sich auch auf Grund neuer Untersuchungen Howell und Cekada aus. Diese Forscher konnten nachweisen, dass das Prothrombin im hämophilen Blut in etwa der gleichen Menge vorhanden ist wie im normalen. Sie finden aber, dass die Blutplättchen des hämophilen Blutes sich durch ihre viel grössere Stabilität von denjenigen des normalen Blutes unterscheiden und führen also die Hämophilie auf diese Anomalie zurück.

E. Zunz und La Barre (Soc. Biol. 93, 867; 1925) fanden das Blut bei mehreren Fällen von anaphylaktischem Schock ungerinnbar.

Weitere kinetische Studien werden wohl festere Grundlagen für die Beurteilung des Mechanismus des Blut-Gerinnungsvorganges schaffen. Bei dem jetzigen Stand der Forschung hat der Verf. sich nicht imstande gesehen, eine einheitliche Darstellung der Fibrinbildung zu geben und ein Referat über die zahlreichen „Theorien“ würde dem Leser kaum eine grössere Klarheit über die Sachlage vermitteln. Deswegen mag die obige Beschreibung der wichtigsten Tatsachen genügen.

Anhang: Methoden zur Messung der Blut-Gerinnungszeit.

Sämtliche Methoden leiden daran, dass die chemische Reaktion, welche den zeitlichen Verlauf bestimmt, ihrer Natur nach nicht bekannt ist, und also eine sekundäre Erscheinung, nämlich das Auftreten einer Trübung oder Flockung und die dadurch verursachte Zustandänderung des Systems zum Gegenstand der Messung gemacht werden muss.

---

[1] Yamada, Biochem. Zs 87, 273; 1918.

[2] Sahli, Zs klin. Med. 56, 264; 1905. — Deutsch. Arch. klin. Med. 99, 518; 1910. — Siehe auch Morawitz und Lossen, Deutsch. Arch. klin. Med. 94, 110; 1908.

Wenn durch Bildung des Fibrins die Reaktionslösung in ein makroheterogenes System übergeht, äussert sich die Änderung des Dispersitätsgrades natürlich hinsichtlich der meisten physikalischen Eigenschaften. Zur quantitativen Messung sind die Änderung der Viscosität und die Abnahme der Durchsichtigkeit der Lösung verwendet worden. Über die Änderung der Leitfähigkeit bei der Fibrinbildung gehen die Angaben auseinander.

1. Viscositätsmessungen.

Das Ausfluss-Viscosimeter — etwa die bekannte von Wi. Ostwald angegebene Form — eignet sich nicht ohne weiteres für koagulierende Systeme. Heubner und Rona[1] haben aber bei ihrer Methode, durch welche die Ausflussgeschwindigkeit des Blutes aus engen Glascapillaren gemessen wird, mehrere der bei solchen Bestimmungen auftretenden Schwierigkeiten überwunden.

Für manche klinische Zwecke liefert vielleicht die von Frisch und Starlinger[2] vorgeschlagene Methodik ausreichend genaue Ergebnisse.

Zur Messung zäher Flüssigkeiten oder weicher heterogener Gemische sind mehrere Apparat-Typen ausgearbeitet worden, so ein Fall-Apparat von Ladenburg, ferner Schwingungs-Viscosimeter von Couette[3], Verschaffelt u. a. Ein solches wurde neuerdings von Kugelmass[4] zur Bestimmung der Gerinnungszeit verwendet.

Fuld[5] bestimmt den Zeitpunkt der Gerinnung des Blutes in der Weise, dass er eine Metallkugel durch eine Blutschicht hin- und herschleudert, und feststellt, wann die Bewegung der Kugel durch das (gerinnende) Blut gehemmt wird.

Wöhlisch[6] misst als Gerinnungspunkt denjenigen Zeitpunkt, bei welchem einige Bluttropfen auf einer geneigten, schwach konkaven Unterlage nicht mehr fliessen bzw. ihre Oberfläche verändern.

2. Nephelometrische Methode.

Ob Eintritt und Fortschreiten der Trübung ein geeignetes Mass für die der Blutgerinnung zugrundeliegende chemische Reaktion ist, müssen erst weitere Untersuchungen zeigen. Kugelmass hat in seinen mehrfach erwähnten Arbeiten sich auch eines einfachen Nephelometers bedient. Die Verwendung des Nephelometers, in welchem die trübe Schicht seitlich belichtet ist (System Rona-Kleinmann), dürfte sich auch hier empfehlen.

[1] Heubner und Rona, Biochem. Zs 130, 463; 1922.
[2] Frisch und Starlinger, Wien. klin. Wochenschr. 34, 344; 1924.
[3] Couette, Am. Chim. Phys. (6) 21, 433; 1890.
[4] Kugelmass, Soc. Biol. 87, 885; 1922.
[5] Fuld, Berl. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 28. — Ladenburg, Ann. d. Physik.
[6] Kugelmass, Arch. intern. de Physiol. 21, 139 u. zw. 172; 1923. — Wöhlisch und Pieritz, Zs f. d. ges. exp. Med. 27, 61; 1922.

Nachträge und Druckfehler.

13. Kapitel. Die hydrolysierenden Enzyme der Nucleinsäuren und ihrer Spaltprodukte.

Zur Kenntnis der Substrate: Steudel, Über den partiellen Abbau der Thymonucleinsäure, H. 154, 116; 1926. — Levene und Mitarb., Über Nucleosidasen. — Levene und Ione Weber, Jl Biol. Chem. 60, 693—720; 1924. — Levene und Harry Sobotka, Jl Biol. Chem. 65, 463—477; 1925. — Levene und Simms, Jl Biol. Chem. 65, 519; 1925. — Wohlgemuth, J. und Klopstock, Nucleotidase in der Haut, Biochem. Zs 153, 487; 1924.

Zur Frage der Uricolyse: Thannhauser, Lurz und P. v. Gara, H. 156, 251; 1926.

14. Kapitel. Urease.

Vorkommen: Im Tierkörper: Luck, Biochem. Jl 18, 825; 1924. — Magen-Urease: Luck und Seth, Biochem. Jl 19, 365; 1925.

Im Blut: Murray, Biochem. Jl 19, 294; 1925.

Leberenzym: Cance, Biochem. Jl 19, 134; 1925.

Im Samen von Cucurbitaceen: Saburo Imai (1925).

Nach Versuchen aus diesem Laboratorium (Euler und Brunius, H. im Druck) ist die Wirksamkeit der Urease in einem Ureasepräparat (Arlco-Urease) $Uf = 10 \cdot 10^{-2}$.

Für das von Onodera vermutete Co-Enzym haben wir hier keine Anhaltspunkte gefunden.

Für rohe Urease-Lösungen scheint Tonerdehydrat kein geeignetes Adsorptionsmittel zu sein. Dagegen wurde mit Kaolin bei $pH = 2{,}7$ eine Adsorption von 80% der gelösten Urease erzielt. Elution gelingt bei $pH =$ ca. 9. Dialyse der rohen Enzymlösung führt zu einer Verdreifachung des Uf-Wertes.

Reinigungs- und Darstellungsmethode.

Ein Reinigungsverfahren, das anscheinend sehr effektiv ist, hat J. Sumner (Jl Biol. Chem. 69, 435; 1926) beschrieben. Dieser Forscher unterscheidet lösliche und unlösliche Urease (Sumner und Viola A. Graham, Proc. Soc. exp. biol. a. med. 22, 504; 1925); er fasst beide als Proteine auf.

Zur Kinetik: Revoltella, Biochem. Zs 134, 336; 1922.

Über die Temperaturempfindlichkeit der Urease macht Mori Angaben (Jl of biophysics 1, 54; 1924).

Zur Methodik: D. D. van Slyke, Proc. Soc. exp. biol. a. med. 22, 486; 1925. — Volumetrische Bestimmung von Harnstoff mit Urease: Gruskin, Jl Lab. Clin. Med. 10, 223; 1924.

15. Kapitel. Amidasen, Arginase und Purinaminasen.

Amidasen:

Asparaginase: A. Clementi und G. Cantamessa (Gaz. chim. ital. 54, 781; 1924), Verlauf der Desamidierung des Asparagins.

Hippuricase: Nach A. Palladin nimmt mit fortschreitender Entwicklung des Skorbuts die Fähigkeit des Meerschweinchenorganismus zur Synthese der Hippursäure ab. — T. Shizuaki fand Spaltung von Dibenzoyl-l-Tyrosin und Dibenzoyl-l-Leucin (Chem. Zbl 1926, I, 3240).

Arginase: Die Kenntnis dieses Enzyms ist wesentlich erweitert worden durch eine neue Untersuchung von Edlbacher und Röthler (H. 148, 245 u. 273; 1925), welche die erste Mitteilung (H. 145, 69; 1924) fortsetzt. Für die Bestimmung des aus Kalbsleber dargestellten Enzyms wurde eine neue Methode ausgearbeitet. Kossel und Fr. Curtius (H. 148, 283; 1925) setzten die S. 383 erwähnte Untersuchung von Hino am B. pyocyaneus fort. Das nicht gespaltene Arginin wurde als Salz der Flaviansäure gefällt. In allen Fällen, in denen mit sterilen Emulsionen nach Hino gearbeitet wurde, beobachteten die Verfasser nur Spaltung von d-Arginin. In einer Lösung von d,l-Arginin bleiben also 50% als l-Arginin zurück.

16. Kapitel. Di-Peptidasen.

Levene und Simms (Jl Biol. Chem. 61, 445; 1924) untersuchten die Hydrolyse von Peptiden mit Salzsäure bei 100°. Dabei wurde festgestellt, dass drei Reaktionen gleichzeitig verlaufen:

1. Die Spaltung des Dipeptides in Aminosäuren.
2. Die Bildung eines ringförmigen Anhydrides (Diketopiperazinringes).
3. Die Öffnung des Anhydridringes unter Peptidbildung.

Dagegen konnte die direkte Synthese des Peptides aus Aminosäuren vernachlässigt werden. Dies wurde schematisch folgendermassen ausgedrückt:

$$\text{Anhydrid} \underset{(3)}{\overset{(2)}{\rightleftarrows}} \text{Dipeptid} \xrightarrow{(1)} 2 \text{ Mol. Aminosäure.}$$

Mit dieser Wirkung der Salzsäure vergleichen dann Levene und Simms (Jl Biol. Chem. 62, 711; 1925) die Wirkung des Erepsins (der Dipeptidase). Hier verlaufen zwei Reaktionen gleichzeitig: 1. die Hydrolyse, 2. die Anhydridbildung. Unter der Annahme, dass das neutrale Dipeptid die reagierende Molekülart ausmacht, wird die folgende Formel aufgestellt, deren Herleitung im Original nachgesehen werden muss:

$$kt = \ln \frac{(a - B) Z}{(a - B) Z - X} = \ln \frac{A'}{A' - X}.$$

Hier bedeutet: $k = k_1 + k_2$,
k_1 = Reaktionskonstante der Hydrolyse,
k_2 = Reaktionskonstante der Anhydridbildung,
a = Anfangskonzentration des Dipeptids zur Zeit $t = 0$,
B = Äquivalente der anwesenden Base (NaOH),

$$Z = \frac{k_1 - k_2}{k_1 + k_2}, \quad A' = (a - B)\,Z = (a - B)\,\frac{k_1 - k_2}{k_1 + k_2}.$$

17. Kapitel. Enzymatische Spaltung von Peptonen usw.

Caseinolytische Wirkung von Erepsin-Präparaten: A. Clementi, Biochem. Zs 136, 71; 1923.

Substrate: Levene und Simms (Jl Biol. Chem. 55, 801; 1923) geben eine Berechnung des isoelektrischen Punktes eines Ampholyten mit beliebig vielen sauren und basischen Gruppen

$$I = \sqrt{\frac{\Sigma K_a}{\Sigma K_b} \cdot K_w}$$

Die Bezeichnungen und die Form des Ausdrucks entsprechen der Formel von Michaelis (vergl. I. Teil, 3. Aufl., S. 35).

Methoden zur Bestimmung der Peptid- und Peptonspaltung.

Interferometrische Methode: E. Kaufmann, Biochem. Zs 177, 206; 1926.

18. Kapitel. Tryptase.

Giftwirkung des Chinins: Smorodinzew und Adowa, Biochem. Zs 135, 128; 1924.

Elektrodialyse: Fricke u. Mitarb. Koll. Zs 39, 152; 1926.

21. Kapitel. Autolyse von Organen.

Aktivierung der Leber-Autolyse durch Jod: Steppuhn, Biochem. Zs 174, 84; 1925.

Spezifität des Serum-Trypsins: Fuchs, Biochem. Zs 175, 201; 1926.

Methoden zur Bestimmung der Eiweissspaltung: Rona und Kleinmann, Nephelometrische Untersuchungen über fermentative Eiweissspaltung, Biochem. Zs 169, 320; 1925.

23. Kapitel. Bakterienproteasen.

Untersuchungen über Milchsäurebakterien: Siehe Barthel, Medd. Centralanst. landw. Versuchswesen, Stockholm, 1914—1926.

Druckfehler.

Seite 335 Anmerkung 5 steht Steppuin statt Steppuhn.
Seite 335 Anmerkung 7 steht Me Cance statt Mc Cance.
Seite 342 Anmerkung 1 steht Sunner statt Sumner.
Seite 372 Zeile 18 von oben steht Wishard statt Wishart.
Seite 379 Anmerkung 3 steht Linhard statt Linhardt.
Seite 388 Anmerkung 4 steht Savarè statt Savaré.
Seite 456 Zeile 19 von oben steht Henriquez statt Henriques.

Verzeichnis der hydrolytischen (und koagulierenden) Enzyme und ihrer spezifischen Aktivatoren und Hemmungskörper.

Autoren-Verzeichnis für den 1. und 2. Abschnitt.

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz A.G., Würzburg.